MIRELA CAROLINE VILELA DE OLIVEIRA

Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de pombos (*Columbalivia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas

São Paulo
2016

MIRELA CAROLINE VILELA DE OLIVEIRA

Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de pombos (*Columba livia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2016

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.3380
FMVZ

Oliveira, Mirela Caroline Vilela de
Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de pombos (*Columba livia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas / Mirela Caroline Vilela de Oliveira. -- 2016.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. STEC. 2. EPEC. 3. Zoonoses. 4. Salmoneloses. 5. *Columba livia*. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção Molecular de Patótipos de Escherichia coli em Aves Silvestres Cativas do Estado de São Paulo.", protocolada sob o CEUA nº 2984230514, sob a responsabilidade de **Terezinha Knöbl e equipe; Lilian Aparecida Sanches** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/08/2014.

We certify that the proposal "Molecular Detection of Escherichia coli pathotypes in Captive Wild Birds of São Paulo.", utilizing 500 Birds (500 females), protocol number CEUA 2984230514, under the responsibility of **Terezinha Knöbl and team; Lilian Aparecida Sanches** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/13/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **maio/14** a **maio/16** Área: **Patologia**

Origem:

Espécie: **Aves**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **500**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: O objetivo deste trabalho é realizar o diagnóstico molecular de infecção por Escherichia coli em diferentes ordens de aves cativas do Estado de São Paulo. A amostragem deste trabalho será composta por fezes de aves atendidas no Ambulatório de Aves da FMVZ-USP e aves mantidas em Zoológicos do Estado de São Paulo. Serão avaliados cerca de 500 animais, pertencentes a sete ordens distintas, incluindo: Anseriformes, Galliformes, Psittaciformes, Columbiformes, Stringiformes, Falconiformes e Passeriformes.

Local do experimento:

São Paulo, 29 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44536-1	Data da Emissão: 18/11/2014 12:09	Data para Revalidação*: 18/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Terezinha Knobl	CPF: 151.331.328-24
Título do Projeto: Espemograma e análise histológica de testículos de pombos submetidos à castração química com Gluconato de Zinco	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de animais e procedimento cirurgico	08/2014	08/2015
2	análise dos resultados e elaboração de dissertação	08/2015	08/2016

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Mirela Caroline Vilela de Oliveira	executora	348.520.208-84	351414894 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Parque da água Branca - SP	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Columba livia ("Otide: 90")
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Columba livia

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

Código de autenticação: 16427863

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44536-1	Data da Emissão: 18/11/2014 12:09	Data para Revalidação*: 18/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Terezinha Knobl	CPF: 151.331.328-24
Título do Projeto: Espermograma e análise histológica de testículos de pombos submetidos à castração química com Gluconato de Zinco	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Outras amostras biológicas (Ao término do experimento elas serão eutanasiadas para a coleta de sêmen e de testículos.) Fragmento de tecido/orgão
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta, Puça
3	Método de marcação (Aves)	Anilha colorida

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	

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

Código de autenticação: 16427863

Página 2/3

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: OLIVEIRA, Mirela Caroline Vilela de

Título: Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de pombos (*Columba livia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, aos meus amigos, professores e a Eduardo Michel por terem acreditado e me incentivado a percorrer com entusiasmo, não o caminho mais fácil, mas o mais estreito e valioso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, por tudo que eu sou e pelas pessoas que ele coloca em meu caminho. Obrigada pelo dom da sabedoria e resiliência. Aos meus pais e irmãos que me apoiaram durante toda a jornada.

A minha fiel e lutadora orientadora Terezinha Knobl, que sempre acreditou no meu potencial, me guiou pelos caminhos da veterinária e me ensinou a amar as penosas. Obrigada por seus conselhos, paciência, compreensão e amizade.

Agradeço a Prof Dra Andrea Micke Moreno, que foi meu segundo anjo da guarda nesta caminhada. Obrigada por seus ensinamentos e por permitir o desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Sanidade Suína. Agradeço a Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira e ao Dinho. Obrigado Prof. Dr. Ricardo Pereira e Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, pelos novos aprendizados, suporte e por permitirem o conhecimento de um novo mundo dentro da Veterinária. Serei eternamente grata. Agradeço a M.V. Tamara Cortez, pelo auxílio do CCZ de SP, e aos Zoológicos de SP, que me receberam, e permitiram a coleta das amostras. Obrigada também ao laboratório Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda e ao MV. Dr. Ricardo Lucas por terem cedido amostras do produto Infertile®.

Agradeço a todos meus amigos e companheiros dos Laboratórios de Patologia Aviária, Sanidade Suína e Reprodução Animal por todo apoio e suporte: Maria Gabriela, Marcos Cunha, Yame, Leticia, Ana Paula, Ketrin, Vasco, Rosi, Alexandre, Sandra, Luisa, Pedro, Barbara, Jucelia, Givago, Carlos, Allison, Bruno, Maira.

Gostaria de agradecer a Eduardo Michels, por sempre me apoiar, e me acalmar nos momentos de insanidade e desespero.

E para finalizar, agradeço a Elza Faquim e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

OLIVEIRA, M. C. V. **Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de pombos (*Columba livia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas.** [Phylogenetic analysis of *Salmonella* Typhimurium and diarrheagenic *Escherichia coli* isolated a pigeons (*Columba livia*) that perform foraging in zoos grounds: zoonotic implications]. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Pombos (*Columba livia*) são aves exóticas, sinantrópicas, reservatórios de algumas doenças de caráter zoonótico. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar genotipicamente isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreio gênica de pombos domésticos. Foram coletados suabes de 118 pombos provenientes de dois zoológicos de São Paulo. Para a identificação de *Salmonella* spp, as amostras foram submetidas ao pré-enriquecimento em água peptonada 0,1% e incubadas a 37°C por 24-48 horas, seguida do enriquecimento seletivo em caldo de tetrationato de sódio, com incubação a 37°C por 24-48h e plaqueamento em meio seletivo XLT4, a 37°C por 24-48h. Para o isolamento de *E. coli*, as amostras foram semeadas em ágar MacConkey, com incubação a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas foram identificadas por série bioquímica. A técnica de PCR foi utilizada para a confirmação do gênero *Salmonella* spp, identificação dos sorovares de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e para a determinação dos fatores de virulência de *Escherichia coli*. Dentre os 118 animais analisados, 4,23% (5/118) foram positivos para *Salmonella* spp, sendo todos do sorovar *S. Typhimurium*. Foram identificadas estirpes diarreio gênica de *E. coli*, positivas para os fatores de virulência *eae* (8/118), *bfp* (4/118) e *stx2f* (3/118). Na análise filogenética pela técnica de AFLP, as estirpes de *E. coli* diarreio gênica apresentaram uma diversidade genética, mas as estirpes de *S. Typhimurium* foram consideradas clonais. Os dados deste trabalho destacam o risco sanitário relacionado ao forrageamento da espécie *Columba livia* em zoológicos, por meio da confirmação da presença de *Salmonella* Typhimurium, EPEC típica, EPEC atípica e STEC nas excretas destas aves.

Palavras-chave: STEC. EPEC. Zoonoses. Salmoneloses. *Columba livia*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. C. V. **Phylogenetic analysis of *Salmonella* Typhimurium and diarrheagenic *Escherichia coli* isolated a pigeons (*Columba livia*) that perform foraging in zoos grounds**: zoonotic implications. [Análise filogenética de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* diarreogênica isoladas de pombos (*Columba livia*) que realizam o forrageamento em recintos de zoológicos: implicações zoonóticas]. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Pigeons (*Columba livia*) are exotic birds, synanthropic and reservoirs of some zoonotic diseases. The aim of this study was to characterize genotypically isolates of *Salmonella* spp. and diarrheagenic strains of *Escherichia coli* isolated from domestic pigeons. Fecal swabs of 118 pigeons were collected from two zoos in São Paulo. The samples were subjected to a pre-enrichment step being placed in peptone water solution of 0.1% and incubated for 24-48 h at 37°C. Thereafter it was performed selective enrichment step where the samples were transferred in sodium tetrathionate broth with incubation for 24-48 h at 37°C, followed by plating on selective medium XLT4 incubation for 24-48h at 37°C for isolation and identification of *Salmonella* spp. The samples were also placed in BHI broth for a period of 24 h and then plated on MacConkey medium with incubation for 24h at 37°C for isolation of *E. coli*. Subsequent microbiological step, the isolates were subjected to DNA extraction using the methodology described by Boom for PCR. Polymerase chain reaction (PCR) was employed for identification of the *Salmonella* serovar Enteritidis and Typhimurium and virulence factors of *E. coli*. Of the 118 animals tested, 4.23% (5/118) were positive for *Salmonella* spp., all characterized as being serovar S. Typhimurium. Some *E. coli* strains (8/118) were positive for virulence factors: *eae*, 3.38% (4/118), *bfp* and 2.54% (3/118) to *stx2f*. In phylogenetic analysis by AFLP, strains of diarrheagenic *E. coli* showed a genetic diversity, but S. Typhimurium presented a clonal relationship. Data from this study highlight the health risk related to the foraging of *Columba livia* in zoos, because they can be reservoirs of *Salmonella* Typhimurium, typical and atypical EPEC and STEC.

Keywords: STEC. EPEC. Zoonoses. Salmonellosis. *Columba livia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores de virulência do patótipo ETEC.....	27
Figura 2 - Captura dos pombos forrageiros em zoológico da cidade de São Paulo	30
Figura 3 - Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 4 - Perfis genotípicos (SE AFLP) de <i>Salmonella</i> Typhimurium isolada de pombos forrageiros presentes nos zoológicos de São Paulo.....	37
Figura 5 - Perfis genotípicos (SE AFLP) de patótipos diarreogênicos de <i>Escherichia coli</i> de pombos forrageiros oriundos dos zoológicos de São Paulo.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Zoonoses transmitidas por Columba Livia	20
Quadro 2 - Classificação do gênero Salmonella em espécie e subespécie com os respectivos sorovares.....	24
Quadro 3 - Classificação de E. coli em diarreiogênicas e extra-intestinais	26
Quadro 4 - Sequência dos primers utilizados para identificação molecular de Salmonella spp. de pombos domésticos (Columba livia)	32
Quadro 5 - Sequência de primers utilizados para detecção das categorias de E. coli diarreiogênicas	33
Quadro 6 - Sequência de primers utilizados para subtipagem da toxina STX-2	34

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Número de animais positivos para os fatores de virulência de <i>E. coli</i> diarreiogênicas.....	38
Tabela 2 - Categorias (patotipos) de <i>E. coli</i> isoladas de pombos domésticos forrageadores dos zoológicos de São Paulo	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Pombos domésticos	18
2.2	Zoonoses transmitidas por pombos.....	20
2.3	Salmoneloses.....	22
2.4	Escherichia coli diarreiogênicas.....	25
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Cultivo e isolamento bacteriano.....	30
4.2	Extração de DNA.....	31
4.3	Deteção dos sorovares de Salmonella spp.....	32
4.4	Deteção dos genes de virulência de E. coli diarreiogênicas	32
4.5	Subtipagem da toxina shiga 2.....	34
4.6	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (SE-AFLP).....	35
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O pombo (*Columba livia*) é uma ave de origem exótica que chegou aos solos brasileiros por meio de imigrantes europeus no século XVI. Devido sua adaptabilidade ao país e as condições favoráveis à sua sobrevivência obtiveram um crescimento populacional expressivo (SCHULLER, 2005).

De acordo com a Instrução normativa nº141 de 2006, os pombos se enquadram na definição de fauna sinantrópica nociva, juntamente com outras espécies animais (roedores, baratas, morcegos), em razão dos riscos à saúde pública, além de gerarem transtornos no setor econômico e ambiental. Os pombos são considerados reservatórios de cerca de 70 doenças, com destaque para as de etiologia fúngica (criptococose e a histoplasmose) e bacteriana (clamidiose, campilobacteriose, salmonelose e colibacilose) (MIRANDA et al., 2014).

A dificuldade em controlar a fauna sinantrópica é um desafio constante em parques e zoológicos, uma vez que os recintos são planejados para obter o maior conforto possível aos animais, sendo também atrativos para as aves de vida livre, que encontram nestes locais as condições ideais para a sobrevivência: água, alimento e abrigo (TASSI, 2008).

Santos et al. (2003) afirmaram, em um estudo sobre o forrageamento de pombos no Bosque dos Jequitibás – Campinas SP, que populações de até setenta aves tornaram-se frequentadoras assíduas do parque, adaptando-se aos horários de arraçoamento de algumas espécies, com notada preferência por animais cuja dieta inclui milho. Segundo os autores, a presença das aves altera o balanceamento de nutrientes dos animais em exposição. Uma vez atendida às exigências nutricionais dos pombos, a quantidade de indivíduos da população tende a aumentar de forma expressiva, com prejuízo para a alimentação dos animais cativos e aumento do risco sanitário associado à transmissão de doenças, muitas delas com potencial zoonótico (FERREIRA, 2012).

O Brasil possui 110 zoológicos, sendo 57% destes localizados na região sudeste. Estima-se que cerca de 50.000 animais cativos estejam alojados nestas entidades (SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS E AQUARIOS DO BRASIL, 2016). Além da finalidade de entretenimento do público, estes estabelecimentos exercem um

papel importante na conservação *ex situ* no país, participando dos programas de reprodução de espécies ameaçadas e de campanhas nacionais e internacionais de educação para a conservação (SOCIEDADE DE ZOOLÓGICOS E AQUARIOS DO BRASIL, 2016). Não existem dados disponíveis na literatura sobre o número de animais sinantrópicos que co-habitam estes locais, mas certamente o forrageamento dos pombos é um problema na maioria dos parques zoológicos do Estado de São Paulo. Diante deste panorama, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de pombos domésticos, que realizam o forrageamento nos recintos dos zoológicos, como fontes de infecção de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* diarreiogênica. A análise filogenética destes isolados pode ser uma ferramenta importante para avaliar as implicações sanitárias destas aves na transmissão de zoonoses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pombos domésticos

Os pombos pertencem à Ordem dos Columbiformes. *Columba livia* é a espécie conhecida como pombo doméstico. Apresenta distribuição cosmopolita, vivendo em colônias e se alimentando de sementes e frutas (CLERGEAU et al., 2006). Os pombos foram introduzidos no Brasil pelos europeus por volta do século XVI com o objetivo de domesticação e utilização dos animais como pombo correio, mas os mesmos passaram a fazer parte da ornamentação de parques e igrejas, e até mesmo da alimentação humana (BENCKE, 2007).

Pombos são animais prolíficos, com perfil reprodutivo marcado por até três oviposições ao longo do ano, e tendem a ser monogâmicos. Quando expostos a uma maior oferta de alimento, assim como outras espécies sinantrópicas, estes animais tendem a alterar o seu ciclo reprodutivo, podendo duplicar o número de filhotes por ano (NUNES, 2003).

Clima, disponibilidade de alimento, *habitat* e falta de predador natural são pontos importantes que favorecem o crescimento populacional da espécie (BUCHER; RANVAUD, 2006). No caso dos pombos, a espécie teve uma excelente adaptabilidade aos solos brasileiros e atualmente é considerada fauna sinantrópica nos grandes centros urbanos do Brasil (SCHULLER, 2005).

Uma pesquisa desenvolvida por Schuller (2003) aponta que o número de reclamações feitas ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo sobre problemas com pombos no ano de 2002, foi equivalente a quase a metade do número de reclamações sobre roedores.

A presença de pombos pode representar risco de transmissão de alguns patógenos de caráter zoonótico. Embora a população tenha uma percepção equivocada sobre a participação destas aves na transmissão de doenças como a leptospirose e a raiva, doenças transmitidas somente por mamíferos, (MIRANDA et al., 2014), é fundamental o conhecimento da população frente à epidemiologia das doenças transmitidas por aves, que justificam a necessidade de se reduzir o risco a exposição a estes animais (AGUIAR; LUCIANO, 2011).

Outro ponto relevante é a contaminação de produtos alimentícios através da deposição de dejetos sobre os mesmos (SILVA, et al., 2014). A contaminação pode ocorrer em diversos segmentos da cadeia de alimentos, desde sua fabricação até sua comercialização. Porém, o setor de estocagem recebe uma atenção especial por ter uma maior probabilidade de exposição aos pombos e outras pragas (FERREIRA, 2012). A fonte hídrica também pode ser contaminada por parasitas presentes nas excretas destes animais (OKAWA et al., 2001; LILLEHAUG et al., 2005; SCHULLER, 2005). Nunes (2003) também pontua as perdas econômicas associadas aos gastos para a manutenção e troca de tubulações, forros e equipamentos, danificados por acúmulo de fezes, penas e ninhos dos pombos no ambiente.

Em decorrência dos diversos transtornos gerados pelos animais sinantrópicos foi publicada a Instrução Normativa IBAMA nº 141, em 19 de dezembro de 2006, com a finalidade de regulamentar o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. De acordo com esta Instrução Normativa, os animais que causam transtornos econômicos e/ou ambientais significativos, que se relacionam de forma negativa com o homem ou que representem risco à saúde pública pertencem à fauna sinantrópica nociva. Medidas de manuseio, remoção ou eliminação direta das espécies são consideradas proibidas, de modo que o manejo ambiental deva ser realizado através da eliminação ou alteração de recursos usufruídos pela fauna sinantrópica, a fim de alterar sua estrutura e composição.

Apesar do nítido aumento populacional dos pombos, não temos base científica suficiente para determinar o impacto nos centros urbanos, o que dificulta o processo de ações eficazes das unidades de saúde (FERREIRA, 2012; SANTOS 2014; SILVA, 2014).

Entre as medidas de controle populacional aplicadas aos pombos, encontram-se ações como diminuir a oferta de componentes essenciais à vida e medidas relacionadas com a infra-estrutura, através de instalação de barreiras nos lugares que podem servir como *habitat*, como elucidado por Santos (2014):

Obstruir passagens, impedir o pouso, vedar aberturas, dar destino adequado ao lixo e não ofertar alimentos de forma direta ou indireta aos pombos, medidas hoje preconizadas pela Vigilância Ambiental, são medidas utópicas a serem adotadas por toda a população brasileira em um curto prazo. Pautar-se exclusivamente nestes aspectos, baseando-se em listagem de doenças que estes animais são transmissores, é passividade frente às zoonoses emergentes.

2.2 Zoonoses transmitidas por pombos

A Organização Mundial de Saúde define zoonose como toda e qualquer infecção e doença que seja transmitida naturalmente por animais vertebrados aos seres humanos. Até o momento são descritos mais de 200 zoonoses, sendo geradas por diversos patógenos (bactérias, vírus, fungos e parasitas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O pombo está vinculado como fonte de infecção de algumas doenças zoonóticas, como criptococose, clamidiose, dermatites e histoplasmose conforme ilustrado na Quadro 1 (SCHULLER, 2005; FERREIRA, 2012; SANTOS, 2014).

Quadro 1- Zoonoses transmitidas por *Columba Livia*

	Afecção	Agente etiológico	Via de Transmissão	Agravos
Fungo	Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Inalação de fezes secas contaminadas	Meningite subaguda ou crônica
	Histoplasmose	<i>Histoplasma capsulatum</i>		Quadro pulmonar
Bactéria	Clamidiose	<i>Chlamydophila psittaci</i>	Inalação de fezes secas ou secreções contaminadas	Quadro pulmonar, emese e diarreia
	Salmonelose	<i>Salmonella</i> spp.	Ingestão de carne, ovos e verduras contaminadas	Toxinfecção alimentar
Ácaro	Dermatites	<i>Ornithonyssus</i> spp.	Contato com da pele com o agente	Petéquias e prurido no corpo
-	Alergias	Poeira com resíduo orgânico, penas	Inalação de fezes secas e ambiente com ninhos	Rinite e bronquite em pessoas mais sensíveis

Fonte: Adaptado de: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/sal de/vigilancia_em _sau de/control de _zoonoses/animais _sinantropicos/index.php?p=4594

O aumento populacional da espécie está diretamente relacionado a uma maior probabilidade de número de casos de doenças, em razão do aumento no volume de excretas no ambiente, que favorece a contaminação cruzada e a perpetuação do agente. Pelo fato de transmitirem um número considerável de zoonoses, toda a população é afetada, porém as pessoas mais debilitadas, fragilizadas (ex. idosos, crianças, imunossuprimidos) são o grupo de maior risco de gravidade para estas enfermidades (NOMISMA, 2003).

Os pombos, em sua maioria, ficam localizados em lugares onde se têm uma maior oferta de alimento, como nas capitais e complexos portuários como relatado por Aguiar e Luciano (2011). Além do risco de contaminação de alimentos, os pesquisadores destacam o risco ocupacional dos trabalhadores portuários frente à probabilidade de transmissão de zoonoses.

Um levantamento realizado por Silva e Capuano (2008) sobre a ocorrência de fungos e parasitas em material fecal de pombos em Ribeirão Preto - SP apontou 51/68 (75%) das amostras positivas para *Cryptococcus* spp, e 22/68 (32%) positivas para parasitas. Em trabalho semelhante desenvolvido por Reolon et al. (2004) em Porto Alegre - RS, 88/88 (100%) das excretas de pombos foram positivas para *Cryptococcus neoformans*. Takahara et al. (2013) também descreveram a problemática dos pombos como fontes de infecção do *Cryptococcus neoformans*, relatando um percentual de 6,6% (8/122) de positividade em amostras de fezes, na cidade de Cuiabá – MS.

As micoses sistêmicas têm sido consideradas como as zoonoses mais freqüentemente relacionadas ao contato com estas aves. No entanto, os pombos também participam da transmissão de doenças bacterianas e virais. Casos humanos de clamidiose (*Chlamydia psittaci*) foram relatados no estado de Minas Gerais, por Moschioni et al. (2001). No ano de 2013, a China relatou casos de humanos infectados com o vírus da influenza aviária (H7N9), detectado em diferentes espécies aviárias, inclusive nos pombos (WHO, 2013).

Embora existam inúmeros estudos sobre a detecção e prevalência de agentes patogênicos em pombos domésticos, ainda não se sabe a dimensão do risco que esta espécie representa a saúde da população e de outros animais cativos. Não se têm dados apurados na área médica, sendo muitos casos subnotificados, com falhas de amostragem, de taxas de mortalidade e sítios de exposição, o que dificulta o processo epidemiológico para o controle e erradicação das fontes de infecção e dos reservatórios (NOMISMA, 2003).

A percepção da população frente à problemática da superpopulação é outro fator que deve ser levado em consideração. Ao contrário de outras espécies sinantrópicas, para as quais a sociedade demonstra aversão, o pombo desperta, em uma parcela da população, um sentimento de alegria, companheirismo e símbolo religioso, o que dificulta o controle do mesmo, visto que parte da população estimula sua permanência no ambiente. Tal fato é elucidado em trabalho realizado por

Oliveira e Souza (2014). A aplicação de um questionário revelou que 43% dos entrevistados concordam com a permanência dos animais no local e 93% desconhecem o risco do pombo como veiculador de zoonoses. Em contrapartida, o trabalho desenvolvido por Miranda et al. (2014) demonstraram que 95,8% da população reconhece o pombo como fonte de infecção de doenças, porém cerca de 73,4% não sabe quais doenças são transmitidas e fazem a associação do animal com os roedores, reafirmando o dito popular de que os pombos são “ratos com asas”.

Doenças bacterianas como a Salmonelose e a colibacilose são frequentemente relatadas em animais cativos em zoológicos, mas a possibilidade de transmissão por meio do forrageamento de pombos tem sido pouco investigada (MATIAS, 2014).

2.3 Salmoneloses

Salmonelose é uma das doenças mais frequentes quando se aborda temas referentes a aves, zoonoses, toxi-infecção alimentar e doenças intestinais (ANVISA, 2012). No entanto, apesar de ser um assunto frequentemente debatido, o controle de salmonelose ainda é insuficiente, devido à diferença de sorovares e persistência no ambiente (CARDOSO; TESSARI, 2013).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO), ainda nos tempos atuais (2016), as doenças de caráter diarreico representam mais de 50% das doenças transmitidas via alimento, sendo responsáveis por cerca de 550 milhões de casos de diarreia em humanos, e por 230 mil mortes por ano. Entre os principais agentes dos quadros de infecção alimentar, destacam-se as infecções pelo grupo de *Salmonella* paratífóides.

Os casos de toxi-infecção alimentar no Brasil e nos Estados Unidos apresentam a *Salmonella* spp. como o micro-organismo mais isolado (QUINN et al., 2005), caracterizada como o patógeno de maior relevância entre as doenças bacterianas de caráter entérico em homens e animais (BRENNER et al., 2000). Outro exemplo de problemática causada por este agente é referente ao impacto frente ao mercado de exportação de produtos de origem animal, pois dependendo

da positividade do agente no alimento, a carga pode ser bloqueada no país, impedindo acessos a novos mercados. Lembrando que o mercado brasileiro é uma peça essencial no agronegócio, pois o país é o primeiro colocado no *Ranking* mundial de exportação de carnes de frangos (ABPA, 2016).

A adoção da nomenclatura *Salmonella* para um novo gênero de bactérias surgiu no final do século XIX por Lignières em homenagem a Daniel Salmon, o primeiro médico veterinário que isolou a bactéria em suínos em meados de 1880 (LÁZARO, 2008). O agente pertence à família Enterobacteriaceae, que agrupa vários patógenos com características zoonóticas, sendo constantemente associados a casos de infecção hospitalar e infecções intestinais em todo o mundo (TRABULSI, 2006).

O gênero *Salmonella* é representado por bactérias com morfologia de bacilos Gram negativos, não formadores de esporos. Salmonelas de relevância clínica não são fermentadoras de lactose (Lac-), entretanto podem vir a expressar tal característica, caso ocorra uma transferência de plasmídeos contendo o operon Lac+. Em relação à mobilidade, elas podem ser imóveis (sem flagelo), monofásicas (uma fase) ou bifásicas (fase 1 e 2) conforme a presença ou ausência de flagelos e em qual fase se encontram, e que podem se alterar de acordo com os genes H1 e H2 que realizam a síntese flagelar (TRABULSI, 2006).

Ao longo dos anos, o gênero *Salmonella* vem sofrendo alterações de taxonomia, sendo na atualidade dividida em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* sendo a espécie entérica subdividida em seis subespécies que contém diversos sorotipos baseados em sua composição antigênica em relação aos seus antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (GRIMONT; WEILL, 2007; LÁZARO, 2008; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS, 2009; RODRIGUES, 2011).

Inúmeros sorovares têm sido descritos no gênero *Salmonella* spp. No ano de 2006, Trabulsi descreveu 2.501 sorovares. Sete anos após, Cardoso e Tessari (2013) relataram 2.610 sorovares. Em 2014 foram reportados 2.659 sorovares, segundo Jeanjean et al. (Quadro 2). No entanto os sorovares mais frequentemente isolados são os pertencentes à subespécie *S. enterica*, independente do ano de isolamento (TRABULSI, 2006; LÁZARO, 2008).

Quadro 2 - Classificação do gênero *Salmonella* em espécie e subespécie com os respectivos sorovares

Espécie	Subespécie	nº sorovares
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	1586
	<i>salamae</i>	522
	<i>arizonae</i>	102
	<i>diarizonae</i>	338
	<i>houtenae</i>	76
	<i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	-----	22
Total		1659

Fonte: adaptada de Jeanjean et al. (2014).

É sabido que para um agente se perpetuar em uma população ao longo dos anos, é necessário que este encontre, além de outros fatores, um hospedeiro e uma condição de ambiência favorável. A dificuldade de se controlar as bactérias do gênero *Salmonella* está relacionada à extensa rede de hospedeiros que engloba quase todos os animais domésticos e selvagens, além do homem, e de sua sobrevivência em ambientes, água e alimentos contaminados com dejetos de animais infectados. Em contra partida, os sorovares apresentam diversos graus de especificidade, podendo alguns destes gerar infecções apenas em humanos ou em humanos e animais, mas com patogenias distintas (TRABULSI, 2006).

Entre os animais, as aves são frequentemente vinculadas aos casos de transmissão de *Salmonella* via alimento, gerando prejuízo econômico e maior atenção no setor de Saúde Pública. Frente a este cenário, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), com o intuito de garantir o padrão sanitário da avicultura brasileira, e concomitantemente garantir um alimento seguro a população (BRASIL, 1994).

Pulorose, Tifo aviário e Paratifo aviário são as enfermidades que mais acometem as aves. Tanto a Pulorose quanto o Tifo aviário são doenças bacterianas septicêmicas e têm como principais hospedeiros as galinhas e os perus, sendo ocasionadas pela *S. Pullorum* e *S. Galinarum*, respectivamente. No caso da pulorose as aves jovens e os pintinhos de 1 dia são os mais acometidos, e no Tifo

aviário ocorre o inverso, sendo as aves adultas as mais afetadas (SHIVAPRASAD, 2000).

Dentre os agentes mais comumente encontrados nos casos de paratifo aviário estão *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, contudo há relatos de isolados de *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg* (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS, 2009; BACK, 2010). O Paratifo aviário é a doença associada com quadros de toxi-infecção alimentar em humanos, sendo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* as mais frequentes (JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA, 2011). Estes dois sorovares também são de notificação compulsória, segundo as regras do PNSA (BRASIL, 1994).

2.4 *Escherichia coli* diarreiogênicas

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae. A designação do nome teve origem no relato do médico Theodor Von Escherich em 1885, sendo o primeiro a isolar o agente em fezes de crianças saudáveis. *E. coli*, como usualmente é conhecida, é uma bactéria Gram negativa, não formadora de esporos, imóvel ou móvel pela presença de flagelos peritríquios, anaeróbia facultativa e produtora de catalase (GYLES, 1994; SUSSMAN, 1997; TRABULSI; ALTHERTHUM, 2008).

Constituem a microbiota intestinal de mamíferos e de algumas espécies de aves. Entretanto, alguns sorogrupos podem desencadear enfermidades de caráter intestinal (*E. coli* diarreiogênicas) e extra-intestinal (ExPEC - Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*) (NATARO; KAPER, 1998; RUSSO, 2000; KAPER 2004). As ExPEC podem ocasionar doenças do trato respiratório e urinário, meningite e sepse (SUSSMAN, 1997; TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

O grupo diarreiogênico é subdividido em seis patótipos (categoria patogênica), de acordo com uma combinação de fatores de virulência, que desencadeiam mecanismos de patogenia distintos (Quadro 3) (RUSSO, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; SANTOS et al., 2009; MATURANA et al., 2011).

Quadro 3 - Classificação de *E. coli* em diarreio gênicas e extra-intestinais

<i>Escherichia coli</i>	
Diarreio g ênica (Patótipo)	Extra-intestinal (ExPEC)
Enterotoxigênica (ETEC)	<i>E. coli</i> patogênica para aves (APEC)
Enterohemorrágica/Produtora de toxina Shiga (EHEC/STEC)	Uropatogênica (UPEC)
Enteropatogênica (EPEC)	<i>E. coli</i> causadora de meningite e sepse (MNEC)
Enteroinvasiva (EIEC)	
Enteroagregativa (EAEC)	
Aderência difusa (DAEC)	

Fonte: adaptada por Oliveira, M. C. V, 2016.

Consideram-se fatores de virulência todos os mecanismos que auxiliam o agente a desencadear um processo patológico no hospedeiro (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Em razão disso, a patogenicidade das estirpes de *E. coli* vai depender de quais fatores de virulência estão presentes. A presença dos fatores de virulência está relacionada com genes em ilhas de patogenicidade (PAI) no cromossomo bacteriano, ou com a aquisição de elementos móveis como fagos e plasmídeos (KARIYAWASAM et al., 2006).

O patótipo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), recebe outras duas denominações: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e Verotoxigênica (VTEC). Isto ocorre devido à associação do agente aos sinais clínicos apresentados, ou sua associação de acordo com as toxinas produzidas e seu efeito citopático. Trata-se de uma cepa produtora de toxinas Shiga do tipo 1 (STx1) e do tipo 2 (STx2), as quais têm ação inibitória a síntese protéica (FRANK, 1998). O gene *eae* presente na PAI da EHEC (presente também em outros patótipos), codifica a Intimina, proteína responsável pela lesão em forma de pedestal (“*attaching and effacing*”) na mucosa intestinal (PARMA et al., 2000; UGRINOVICH et al., 2007).

Nos humanos a cepa produtora de STx1 é a mais reconhecida, devido o número de casos resultantes em síndrome hemolítica-urêmica, colite ulcerativa e hemorrágica (RILEY et al., 1983).

ETEC é caracterizada pela produção de enterotoxinas, agrupadas como termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). Ambas são diferenciadas e categorizadas de

acordo com o mecanismo de ação, estrutura, teste de neutralização e ao sítio de localização do gene codificador (Figura 1) (LANG et al., 1994; WRAY; WOODWARD, 1997; PARMA et al., 2000).

Figura 1 - Fatores de virulência do patótipo ETEC

Fonte: Adaptado por Oliveira, M. C. V. (2016).

Cepas de EAEC são consideradas por alguns autores como um patótipo emergente, sendo relacionada a quadros intestinais em crianças e adultos independentemente do estágio de desenvolvimento do país (HUANG et al., 2004; WEINTRAUB, 2007). A patogenicidade da infecção inclui a formação de biofilme “*in vitro*” e “*in vivo*”, com um padrão de aderência agregativo e a produção da adesina (AIDA-I) e das toxinas EAST-1, *pic* e *pet*. Estas toxinas são capazes de estimular o processo de secreção intestinal. Destas toxinas, a enterotoxina termoestável (EAST-1) foi a primeira a ser reconhecida, porém ela também pode ser encontrada em outros patótipos (SEARS; KAPER, 1996; FRYDENDAHL, 2002). O trabalho desenvolvido por Niewerth et al. (2001), mostra a interação entre a adesina envolvida na aderência difusa (AIDA-I), com outros fatores de virulência como o fator F18 e a toxina variante produzida pela STEC.

A EPEC é um dos patótipos de maior relevância na saúde pública devido a altas taxas de diarreia aquosa, emese e febre em humanos, em especial em crianças (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002; CLARKE et al., 2003). Relacionada a países com problemas sanitários, baixa qualidade de água, e populações mais carentes (SILVA; SIIVA, 2006). No hospedeiro também promovem a lesão *Attaching and effacing* (A/E), com aderência íntima do agente com as células epiteliais, promovendo destruição das microvilosidades e formação de pedestal. Atualmente a EPEC é dividida em dois tipos: EPEC típica e EPEC atípica, dependendo da combinação ou ausência de determinados fatores de virulência (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002).

Do mesmo modo que a EPEC, a DAEC também é classificada como típica ou atípica. Considerada como patógeno emergente, relacionada causas de diarreia em crianças e adultos imunossuprimidos em países desenvolvidos (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Ainda nos dias atuais, a patogenia deste grupo não está estabelecida, embora já se conheça alguns fatores de virulência envolvidos (TADDEI et al., 2003; GUIGNOT et al., 2007).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) desencadeia quadros de desarranjos intestinais, sendo responsável por casos de mortalidade em crianças, porém é frequente em países desenvolvidos e apresenta o ser humano como reservatório (CLARKE, 2001; FENG; WEAGANT, 2002). A diarreia desta cepa tem como característica ser abundante podendo ter sangue e muco. O mecanismos de lesão é semelhante ao da *Shigella* spp., com invasão celular, inflamação e necrose do órgão (NATARO; KAPER, 1998; FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2011).

Um trabalho de revisão de literatura sobre *E. coli* diarreiogênicas, publicado em 2014, realça a importância e a problemática que este grupo gera a nível de saúde animal e principalmente em saúde pública, sendo considerado um dos agentes de maior importância na doenças veiculadas por alimento (CHAUDHARRY; MANE, 2014).

A transmissão do agente a novos hospedeiros e sua permanência no ambiente é de fácil repercussão, visto que a via de eliminação do agente é através de excretas fecais, contaminando solo, alimento e água, propiciando assim um aumento da probabilidade de ingestão do agente, seja por outra espécie animal ou humano.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a participação de pombos domésticos que realizam o forrageamento nos recintos dos zoológicos como fontes de infecção da salmonelose e da colibacilose.

Os objetivos específicos foram:

- Isolar *Salmonella* spp e *Escherichia coli* a partir de fezes de pombos domésticos que realizam forrageamento em zoológicos.
- Identificar o sorovares de *Salmonella* spp.
- Detectar a presença de fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas.
- Realizar uma análise filogenética destes isolados por meio da técnica de AFLP.
- Discutir as implicações sanitárias destas aves na transmissão de zoonoses.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas 118 amostras de fezes de pombos domésticos (*Columba livia*), coletadas por meio de suabe estéril. As amostras foram coletadas de pombos que realizam o forrageamento em dois zoológicos do Estado de São Paulo, no período de 2014 a 2015. As amostras foram transportadas até o laboratório sob-refrigeração e processadas no mesmo dia da coleta. A captura dos animais foi realizada com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e uso de uma gaiola de metal com iscas de alimento (Figura 2).

Figura 2 - Captura dos pombos forrageiros em zoológico da cidade de São Paulo

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2015).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-CEUA e protocolado sob o número 2984230514 e SISBIO 44536-1.

4.1 Cultivo e isolamento bacteriano

As amostras de fezes foram homogeneizadas em água peptonada. O isolamento de *Escherichia coli* foi realizado pela semeadura do caldo na superfície do ágar MacConkey, incubado a 37° C por 24 horas.

Para o isolamento de *Salmonella* spp., uma alíquota de 1mL da água peptonada foi adicionada em 9 mL do caldo tetrationato de sódio e os tubos foram incubados em aerobiose por 48 horas a 37°C. Após o período de incubação, uma alíquota de 100µL do caldo foi semeada na superfície do ágar seletivo XLT4. As placas foram incubadas em aerobiose por 24 a 48 horas a 37°C.

Colônias lactose positivas no ágar MacConkey e colônias produtoras de H₂S em XLT4 foram selecionadas e submetidas à coloração de Gram (Figura 3). Três colônias de cada ave foram selecionadas para a realização dos testes bioquímicos em EPM, MiLi e Citrato (Enterokit - Probac®). As colônias identificadas como *E. coli* e *Salmonella* spp. foram submetidas a extração de DNA para subsequente identificação através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), e foram congeladas em Glicerol a -80°C para preservação da amostra.

Figura 3 - Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2015).

Legenda: (A): Isolamento de *Salmonella* spp. em ágar XLT4; (B): Isolamento de colônias lac +, característica de *E. coli* em ágar macConkey (B).

4.2 Extração de DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina, junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA (BOOM et al.,1990).

4.3 Detecção dos sorovares de *Salmonella* spp.

As estirpes de *Salmonella* spp. foram identificadas com os *primers* descritos por Alvarez et al. (2004).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* (Quadro 4), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por 4 min seguidos por 29 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 57°C e 1:30 min a 72°C.

Quadro 4 - Sequência dos *primers* utilizados para identificação molecular de *Salmonella* spp. de pombos domésticos (*Columba livia*)

Agente etiológico	Gene	Pares de <i>primers</i> (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>ompCF</i>	ATCGCTGACTTATGCAATCG	204	Alvarez et al. (2004)
	<i>ompCR</i>	CGGGTTGCGTTATAGGTCTG		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>entF</i> <i>entR</i>	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG TGAACACGTTTCGTTCTTCTGG	304	Alvarez et al. (2004)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>typhF</i> <i>typhR</i>	TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA CCCTGACAGCCGTTAGATATT	401	Alvarez et al. (2004)

Fonte: Adaptado por Oliveira, M. C. V. (2016).

4.4 Detecção dos genes de virulência de *E. coli* diarreio gênicas

As categorias de *E. coli* diarreio gênicas foram identificadas segundo a metodologia descrita por Costa et al. (2010). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer*, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de PCR, e água até o volume final de 50 µL. (Quadro 5).

A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por 5 min seguidos por 35 ciclos de 1,5 min a 94°C, 1,5 min. a 55°C e 1,5 min a 72°C, e extensão final por 10 min. a 72°C.

Quadro 5 - Sequência de *primers* utilizados para detecção das categorias de *E. coli* diarreio gênicas

Fatores de Virulência	Iniciador	Sequência (5`-3`)	Produto (pb)
Toxina Termo Estável	ST-1 ST-2	CTGTATTGTCTTTTTCACCT GCACCCGGTACAAGCAGGAT	182
Toxina Termo Lábil	LT-1 LT-2	GCGACAAATTATACCGTGCT CCGAATTCTGTTATATATGT	707
Fímbria BFP	EP-1 EP - 2	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT GCCGCTTTATCCAACCTGGT	550
Intimina EAE	EAE-1 EAE-2	AAACAGGTGAAACTGTTGCC CTCTGCAGATTAACCTCTGC	454
Antígeno de Invasão (ipaH)	EI-1 EI-2	GCTGGAAAACTCAGTGCCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	424
Toxina Shiga 1	STX-1A STX-1B	CAACACTGGATGATCTCAG CCCCCTCAACTGCTAATA	349
Toxina Shiga 2	STX-2A STX 2B	ATCAGTCGTCACCTCACTGGT CTGCTGTCACAGTGACAAA	110

Fonte: Adaptado por Oliveira, M. C. V. (2016).

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA), onde 10 µL produto foram corados com 0,7µl de BlueGreen ® (LGC Biotecnologia)

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação ImageMaster® (AmershanBiosciences), e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New EnglandBioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.5 Subtipagem da toxina shiga 2

Os sete subtipos de Shiga toxina-2 foram determinados segundo a metodologia descrita por Scheutz et al. (2012). A PCR foi realizada em um volume total de 20µL, contendo 2.5 µL de água, 10 µL de HotStar Taq Master Mix (Quiagen), 1,25 µL de cada par de primers (5µM na solução de estoque) e 5 µL de DNA. (Quadro 6). A reação foi submetida à desnaturação a 95°C por 15 min seguidos por 35 ciclos de 50 seg a 94°C, 40 seg a 64°C, 60 seg. 72°C, e 3 min a 72°C.

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA), onde 10 µL produto foram corados com 0,7µl de BlueGreen ® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação ImageMaster® (AmershanBiosciences).

Quadro 6 - Sequência de *primers* utilizados para subtipagem da toxina STX-2

Gene	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
stx2a	GCGATACTGRGBACTGTGGCC GCCACCTTCACTGTGAATGTG	347
stx2b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251
stx2c	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGT A CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177
stx2d	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	179
stx2e	CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	411
stx2f	TGGGCGTCATTCACTGGTTG TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424
stx2g	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	573

Fonte: Scheutz et al., 2012.

4.6 Polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (SE-AFLP)

O SE-AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por Mclauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III (sítio de restrição 5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'). Para clivagem do DNA bacteriano, 4 µg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µL. O tubo foi incubado a 37°C por 4 horas.

Após este período, uma alíquota de 5 µL do DNA clivado foi adicionado a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2 (ADH1 5'ACG GTA TGC GAC AG3' e ADH2 5'GAG TGC CAT ACG CTG TCT CGA3'), 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos para realização da PCR.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-X), 1U de *Taq*DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. Submeteu-se as amostras à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C. Realizou-se a detecção dos produtos de amplificação (20 µL produto e 5µl de tampão de corrida 6X) através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação ImageMaster (AmershanBiosciences), sendo os mesmos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa Bionumerics (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA). Foi utilizado o ponto de corte de 90% de similaridade genética para definição os perfis genotípicos (VAN BELKUM et al., 2007). Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados

segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), para determinação do índice discriminatório.

5 RESULTADOS

Dentre os 118 pombos analisados, 5 (4,23%) foram positivos para *Salmonella* spp. Foram isoladas 3 estirpes por animal positivo e todas identificadas como pertencentes ao sorovar *S. Typhimurium*.

As quinze estirpes foram submetidas à análise filogenética pela técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (SE-AFLP), com um índice discriminatório de 0.96. Foram descritos no dendograma as cepas (Animal), o hospedeiro (Host_species), sítio de isolamento (Isolation_site), estado (state) e o ano (year).

Na análise filogenética as estirpes de *Salmonella* Typhimurium apresentam alto grau de similaridade. Adotando-se uma linha de corte que considera clonal estirpes com mais de 90% de similaridade, como sugere Van Belkum et al. (2007), as estirpes se dividiram em dois clusters. Um dos grupos foi representado por 3/15 cepas, todas pertencentes ao mesmo animal, e o segundo grupo com uma representação de 12/15 cepas (Figura 4). Todos os animais positivos para o agente faziam o forrageamento no mesmo zoológico e foram coletados no mesmo período, durante o ano de 2015.

Figura 4 - Perfis genotípicos (SE AFLP) de *Salmonella* Typhimurium isolada de pombos forrageiros presentes nos zoológicos de São Paulo

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2016)

Na pesquisa para a detecção de *Escherichia coli*, 100% (118/118) tiveram o agente isolado em cultivo microbiológico. Posteriormente foram pesquisados os fatores de virulência para cada isolado, dos quais obteve-se 6,77% (8/118) de positividade para o gene de virulência *eae*, 3,38% (4/118) para o gene *bfp* e 2,54% (3/118) para a toxina *stx2* (Tabela 1). Os resultados da subtipagem molecular das estirpes positivas para o gene que codifica a toxina Shiga revelaram se tratar do subtipo *stx2f*.

As estirpes positivas foram agrupadas conforme a combinação dos genes de virulência, resultando em 3 perfis distintos de virulência (Tabela 2). Das 8 estirpes analisadas, 4 foram consideradas pertencentes ao patotipo EPEC típica, por apresentarem os genes *eae* e *bfp*, 1 ao patotipo EPEC atípica (somente o gene *eae*) e 3 ao patotipo STEC, em razão da positividade para o gene que codifica a produção da toxina Shiga. Os animais portadores de *E. coli* diarreiogênicas também eram provenientes de um único zoológico e a coleta foi realizada no segundo semestre de 2014.

Tabela 1 - Número de animais positivos para os fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas

Gene de virulência	Fator de virulência	Nº animais positivos	Percentual de positividade
<i>eae</i>	Intimina (<i>attaching and effacing</i>)	8/118	6,77
<i>bfp</i>	Fímbria BFP (<i>Bundle forming pili</i>)	4/118	3,38
<i>stx2</i>	Toxina Shiga 2	3/118	2,54

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2016)

Tabela 2 - Categorias (patotipos) de *E. coli* isoladas de pombos domésticos forrageadores dos zoológicos de São Paulo

Categoria	Nº de animais (%)	Genes de virulência			
		<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
EPEC TÍPICA	4/8 (50,0)	+	+	-	-
STEC	3/8 (37,5)	+	-	-	+
EPEC ATÍPICA	1/8 (12,5)	+	-	-	-

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2016)

No dendograma obtido após a técnica de SE-AFLP das estirpes de *Escherichia coli* está descrito o número do isolado (identificação), o grupo, os fatores de virulência e o patotipo a qual pertencem. Quando analisado o perfil genotípico dos isolados de *E. coli* obtido por SE-AFLP observa-se heterogeneidade entre as cepas, com o agrupamento de 6 perfis genotípicos distintos (Figura 5). As estirpes identificadas como 32 (STEC) e 34 (EPEC – atípica) foram agrupadas no mesmo cluster, apesar de serem provenientes de animais diferentes, mas do mesmo local e na mesma captura.

Figura 5 - Perfis genotípicos (SE AFLP) de patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* de pombos forrageiros oriundos dos zoológicos de São Paulo

Fonte: Oliveira, M. C. V. (2016)

6 DISCUSSÃO

Os pombos podem ser potenciais fontes de infecção e reservatórios de doenças zoonóticas, através da eliminação de agentes infecciosos via fecal, podendo acometer animais e humanos (SILVA, 2014). Uma das preocupações envolvendo estes animais é intensificada quando em contato com populações mais carentes e em indivíduos que já possuem algum tipo de deficiência imunológica, visto que a patogenia da doença se daria de forma mais severa (QUINN, 2005; SCHULLER, 2005).

É notório o exacerbado número de pombos presentes nas grandes metrópoles, em convívio com a população em diversas áreas da cidade, como praças, feiras, rodoviárias, portos, escolas, entre outros sítios que apresentem oferta de alimento e abrigo para estes animais, resultando em uma correlação positiva entre tais fatores (BUIJS; VAN WIJNEN, 2001; SANTOS, 2003; QUINN, 2005; KAHN, 2012). O registro de reclamações referentes à presença de pombos na região de Niterói alcançou a segunda colocação com um percentual de 18%, ficando atrás apenas do cão com 40% das reclamações (MOUTINHO, 2013).

Pesquisadores fazem uma relação direta entre o aumento populacional do pombo com o risco potencial de transmissão de doenças a sociedade, realçando assim a necessidade de envolver pesquisas de saúde pública que tenham o pombo como objeto de estudo. Embora se conheça a gravidade e o constante aumento desta espécie animal (KAHN, 2012; SANTOS, 2014), a literatura ainda é escassa a respeito da real magnitude do problema populacional e sanitário da presença destas aves em parques e zoológicos.

Miranda et al. (2014) realizaram um projeto sobre a percepção da população frente à espécie *Columba livia*, revelando que cerca de 73,4% da sociedade não tem conhecimento sobre quais doenças esta espécie pode transmitir. Este trabalho relata a detecção de enterobacterias potencialmente patogênicas em populações forrageiras que tem um contato direto com animais cativos e visitantes do que utilizam o parque como uma opção de lazer. Zoológicos exercem um importante papel na sociedade, tanto para parte de conservação de espécies como a de educação ambiental, sendo frequentado por pessoas de diferentes categorias (pesquisadores, escolas, famílias), podendo alcançar mais de 1,5 milhões de

visitantes no período de um ano (ESCOBAR, 2000; LOPES, 2011; FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO, 2014).

No presente trabalho, foram avaliados 118 pombos presentes em dois grandes zoológicos da capital de São Paulo. Dos 118 animais obteve-se um percentual de 4,23% de positividade para *S. Typhimurium*, e 6,77% de positividade para *Escherichia coli* diarreiogênica. Um trabalho semelhante, realizado por Marchant et al. (2016 no prelo)¹ avaliou a prevalência de *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga em animais de zoológicos no Chile, incluindo aves aquáticas e mamíferos terrestres. Das 316 amostras avaliadas no estudo chileno, 7,5% foram positivas para *S. enterica* sorovar Enteritidis, 4,4% foram positivas para *E. coli* do patotipo STEC. Os autores relataram a presença de stx1 e stx2 de forma isolada e em conjunto, sendo todas as estirpes do estudo negativas para o gene *eae*. Os animais que apresentaram maior percentual de positividade para os patógenos foram os da ordem Artiodactyla, e não houve detecção das enterobactérias nas aves, levando a hipótese de não haver compartilhamento das rotas de transmissão entre os pássaros e os mamíferos. Entretanto, ressalva-se que a diferença de positividade entre os animais avaliados possa ser consequência de fatores como o isolamento dos recintos de confinamento, acesso a água tratada e alimentação realizada com boas práticas de higiene, contato com animais sinantrópicos, contato com outros animais e alimentação advinda dos próprios visitantes. Um aspecto que merece maior atenção no trabalho de Marchant et al. (2016 no prelo)² é o fato de se tratar do primeiro relato da presença de *S. Enteritidis* nas três espécies de animais (*Lycalopex culpaeus*, *Sapajus apela* e *Pelecanus thagus*) e também a primeira descrição da detecção de STEC na espécie *Eudorcasthompsonii*.

No Brasil, Santos (2014) detectaram uma taxa de 2% de isolamento de *Salmonella* spp. em pombos do Distrito Federal, sendo as amostras sorotipadas e identificadas como *S. Typhimurium* (1/100) e *S. Saintpaul* (1/100). Embora seja um valor de detecção mais baixo, salienta-se o risco potencial de transmissão do patógeno a população, visto que os locais de coletas utilizados na pesquisa são de grande frequência da população (escolas públicas e particulares, praças, feiras,

^{1,2}MARCHANT, P.; HIDALGO-HERMOSO, E.; ESPINOZA, K.; RETAMAL, P. Prevalence of *Salmonella enterica* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in zoo 5 animals from Chile. **Journal of Veterinary Science**, 2016. No prelo

condomínios e rodoviárias). Além da *Salmonella* spp. foi detectado 97% de positividade de *E. coli*, microrganismo associado a diversos transtornos na saúde pública. No entanto, estes autores não avaliaram a presença dos fatores de virulência associados às infecções diarreio gênicas.

Em Sorocaba foi conduzido um trabalho por Corrêa (2010), que analisou 50 amostras de fezes de pombos de uma escola estadual. Os resultados revelaram 40% de positividade para *Klebsiella* spp, 30% para *E. coli*, 8% para *Shigella* (*flexneri* e *dysenteriae*), 20% para *Enterobacter* spp. e nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp. Os autores levam em consideração que a falta de detecção de salmonela nas fezes pode ser decorrente da competição com os demais coliformes fecais presentes na amostra, dificultando seu crescimento. Todavia, o isolamento de *Shigella dysenteriae* é bastante preocupante, visto que pode gerar casos severos de disenteria. *Shigella* é uma espécie de bactéria próxima a *E. coli* enteropatogênica invasiva e ambas invadem as células intestinais, promovendo inflamação e destruição intestinal (PARSOT, 2005; UD-DIN; WAHID, 2014).

Em alguns contextos, aves selvagens são responsáveis por poluição fecal, por exemplo, aves aquáticas em lagoas amenas (ABULREESH et al., 2004, 2005), e carreadoras de uma grande variedade de agentes patogênicos que podem ser transmitidos a humanos, tanto estando as aves doentes ou aparentemente saudáveis (HUBÁLEK, 2004). Patógenos prejudiciais a criações de aves domésticas ou outros vertebrados têm sido associados a populações destas aves sinantrópicas (HUBÁLEK, 1994, 2004).

Escherichia coli é um dos patógenos de grande relevância na saúde pública, principalmente quando se aborda assuntos referentes à segurança dos alimentos (CHAUDHARY, 2014). Silva et al. (2009) investigaram pela primeira vez o risco de *Escherichia coli* diarreio gênicas presentes em pombos no Brasil. Em seu trabalho foram coletas 100 amostras de fezes de pombos durante um período de um ano, na cidade de Juiz de Fora. As amostras apresentaram 86% de positividade para *E. coli*, e foram relatados percentuais de 7,1% para ETEC, 3,3% para EPEC, 1,1% para STEC e 0,5% para EIEC. As amostras também foram testadas para oito antibióticos de relevância clínica através da técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC), entre os isolados 37,9% apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas, tendo diferentes perfis para cada patótipo de *E. coli*. Além da presença de fatores de virulência, existe ainda um questionamento a respeito dos pombos serem

reservatórios de bactérias resistentes e de seu papel na transmissão destes agentes a outras espécies e ao meio ambiente.

Em relação aos patótipos de *E. coli* encontrados neste trabalho, EPEC típica teve maior predominância (4/8), seguida de STEC (3/8) e EPEC atípica (1/8). O trabalho conduzido por Barboza et al. (2012) na cidade de Jaboticabal, obteve resultado semelhante ao apresentado neste estudo. Ao analisarem 300 amostras de aves selvagens (150 amostras de cloaca e 150 de orofaríngea), e 200 amostras de pombos urbanos (100 amostras de cloaca e 100 de orofaríngea) presentes no Hospital Veterinário da UNESP – campus Jaboticabal, os autores identificaram em PCR de triagem 10,3% (31/300) estirpes de aves selvagens e 12,0% (24/200) estirpes de pombos urbanos positivas para o gene *eae*, 4,0% (12/300) e 0,5% (1/200) estirpes positivas para o gene *stx1* de aves selvagens e pombos, respectivamente. No entanto, o gene *stx2* foi isolado apenas nas aves selvagens 4,3% (13/300). Este dado difere dos obtidos em nosso trabalho, em que as estirpes classificadas como STEC foram positivas para o gene que codifica a toxina do tipo STX2f.

A infecção humana por STEC produtora de toxina STX2f é considerada uma zoonose emergente e tem sido associada ao contato direto com as aves e a ingestão de produtos lácteos (FRIESEMA et al., 2014). Os pombos capturados no trabalho de Barboza et al. (2012) faziam o forrageamento na parte de bovinocultura de leite do hospital veterinário, entrando em contato direto com ruminantes. Segundo Friesema et al. (2014) estirpes produtoras de toxina STX2f representam 25% das infecções humanas por STEC não pertencentes ao sorogrupo O157. Os autores identificaram os sorotipos O132:H34; O113:H6 e O125:H6 em um estudo de prevalência realizado nos países baixos. STX2f foi o último subtipo de toxina descrito, identificado a partir de isolados de *E. coli* em pombos clinicamente saudáveis da Alemanha e Itália (DELL'OMO et al., 1998; SCHIMDT et al., 2000). Inicialmente seu potencial zoonótico foi questionado, mas a literatura atual aponta sua participação como um agente capaz de provocar quadros moderados de diarreia e disenteria em humanos, tendo como fator de risco principal o contato com aves ou a ingestão de produtos advindos da cadeia de produção de leite (FRIESEMA et al., 2014).

Os dados obtidos neste estudo são similares aos observados por Sanches et al. (2014), ao avaliar a presença de cepas diarreiogênicas de *E. coli* em

Columbiformes no Estado de São Paulo. Os autores detectaram uma frequência de 5,5% de EPEC típica, 4,16% de STEC e 2,77 % de EPEC atípica. Percentuais semelhantes foram relatados na cidade de Lima, onde 5,88% dos isolados de pombos foram categorizados como EPEC, e 0,98% como pertencente ao grupo STEC (CABALLERO, 2015).

Caballero et al. (2015), chama a atenção para o potencial reservatório que é o pombo, e alerta sobre o risco potencial que a presença destes animais nas áreas urbanas oferece a população. Além dos achados de EPEC diarreiogênicas, o pesquisador também relatou o isolamento de *Campylobacter jejuni*, outro agente frequentemente isolado a casos de doença entérica em humanos.

Esta mesma problemática também está sendo presenciada em outros países. No Colorado, um trabalho desenvolvido por Pedersen et al. (2006) detectou que 7,9% dos pombos apresentaram algum gene de virulência para *E. coli* patogênica, porém nenhuma ave foi positiva para produção de toxina Shiga. Este fator foi detectado em 7% das amostras de adubo. Os autores também detectaram *Salmonella* dos sorovares Newport, Senftenberg, Typhimurium e Montevideo em pombos. Outro aspecto importante foi a observação de que a detecção de estirpes portadoras de fatores de virulência eram mais frequentes nos animais capturados durante o verão na comparação com o inverno. Tal diferença não foi encontrada nos animais deste estudo.

A análise dos dendogramas obtidos no AFLP demonstrou que existe relação clonal entre as estirpes, principalmente entre *Salmonella* Typhimurium. Este dado sugere a transmissão horizontal de ave para ave, fazendo com que várias aves apresentem a infecção. Este fato pode favorecer a contaminação de água e alimentos dos recintos frequentados, com uma carga microbiana elevada, capaz de alcançar a dose infectante necessária para provocar a doença nos mamíferos alojados nestes recintos de acesso livre aos pombos.

O alerta sobre a importância de um controle populacional frente ao crescimento expressivo dos pombos domésticos nos zoológicos é reforçado pelos dados obtidos, visto que uma parcela dos animais amostrados apresentou positividade para *Salmonella* sorovar Typhimurium, e para *E. coli* diarreiogênica, agentes de caráter zoonótico. Outro ponto relevante a ser abordado neste trabalho

concordando com o questionamento levantado por Marchant et al. (2016 no prelo)³ é a questão da segurança para os trabalhadores do zoológico, onde se faz necessária a adoção de treinamentos, procedimentos de higiene e aviso sobre o risco potencial através do contato com os animais, como medida de vigilância no trabalho. Novos estudos envolvendo uma investigação mais aprofundada nos animais alojados nos recintos do zoológico, cuja presença de pombos é constante, seriam de extrema importância para monitoramento e investigação da transmissão entre aves e mamíferos.

³ MARCHANT, P.; HIDALGO-HERMOSO, E.; ESPINOZA, K.; RETAMAL, P. Prevalence of *Salmonella enterica* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in zoo 5 animals from Chile. **Journal of Veterinary Science**, 2016. No prelo.

7 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos é possível concluir que:

- Os pombos forrageiros atuam como fontes de infecção de *S. Typhimurium* e estirpes de *E. coli* diarreiogênicas, agentes patogênicos de grande relevância na saúde pública e animal;
- Foram identificados os patótipos de EPEC típica, EPEC atípica e STEC.
- A análise filogenética (SE AFLP) demonstrou alto grau de similaridade entre as estirpes de *Salmonella*, com apenas dois perfis genotípicos distintos, sugerindo uma disseminação clonal entre as aves.
- A análise filogenética das estirpes de *E. coli* revelou maior grau de heterogeneidade.

REFERÊNCIAS

ABULREESH, H. H.; PAGET, T. A.; GOULDER, R. Waterfowl and the bacteriological quality of amenity ponds. **Journal of Water and Health**, v. 2, n. 3, p. 183-189, 2004.

ABULREESH, H. H.; PAGET, T. A.; GOULDER, R. Waterfowl and human-pathogenic bacteria at amenity sites: a review. In: **Proceedings of the 3rd World Waterfowl Conference**. 2005. p. 356-362.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.

AGUIAR, M. B.; LUCIANO, L. Avaliação dos riscos de contaminação relacionados com a superpopulação de Columbia Livia (pombos) em Trabalhadores portuários avulsos. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 3, p. 43-49, 2011.

ALVAREZ, J. S. M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIJAR, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of Salmonella in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1734-38, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório anual. Brasil: **Associação Brasileira de Proteína Animal**, 2016. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>>. Acesso em: 10 Mar. 2016.

BACK, A. **Manual de doenças de aves**. 2. ed. Cascavel-PR: Ed. Integração, 2010.

BARBOZA, K. B.; ÁVILA, F. A.; SILVA, S. B. G.; BORGES, C. A.; MALUTA, R. P. *Escherichia coli* Shigatoxigênica e Enteropatogênica em aves selvagens e pombos-urbanos (*Columba livia*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 24., 2012, São Pedro - SP. **Anais...** (S.l.): Unesp, 2012.

BENCKE, G. A. Pombos-domésticos: sugestões para o controle em Escolas Públicas Estaduais de Porto Alegre. Porto Alegre: Museu de Ciências Naturais/FZB-RS/1ª CRE/SE, 2007.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN, D. P. M.; VAN N. J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Programa nacional de sanidade avícola (PNSA). Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos**. Colaboradores: Débora Melyna Marchi e Epidemiologia e Serviços de Saúde. Brasília: MS, 2011. p. 401-407. Disponível em: <portal.saude.gov.br>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. Salmonella Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

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

BUIJS, J. A.; VAN WIJNEN, J. H. Survey of feral rock doves (*Columba livia*) in Amsterdam, a bird-human association. **Urban Ecosystems**, v. 5, n. 4, p. 235-241, 2001.

CABALLERO, M.; RIVERA, I.; JARA, L. M.; ULLOA-STANOJLOVIC, F. M.; SHIVA, C. Isolation and molecular identification of potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in feral pigeons from an urban area in the city of Lima, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 393-396, 2015.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Salmonella enteritidis em aves e na saúde pública: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2013.

CHAUDHARY, S.; KHURANA, S. K.; MANE, B. G. *Escherichia coli*: Animal foods and Public Health- review. **Journal of Microbiology**, v. 1, p. 31-46, 2014.

CLARKE, S. C. Diarrheagenic *Escherichia coli*—an emerging problem?. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 93–98, 2001.

CLERGEAU, P.; CROCI, S.; JOKIMAKI, J.; KAISANLAHTI-JOKIMAKI, M.L.; DINETTI, M. Avifauna homogenisation by urbanisation: analysis at different European latitudes. *Biological Conservation*, v.127, n.3, p.336-344, 2006.

CORRÊA, V.; PEÇANHA, M. P. Determinação da ocorrência de Shigella/Salmonella através do exame de coprocultura em pombal situado no interior da Escola Estadual Joaquim Izidoro Marins, Sorocaba/SP. **Revista Eletronica de Biologia**, v. 3, n. 3, p. 1-13, 2010.

COSTA, A.R.F.; LIMA, K.V.B.; SOUSA, C.O.; LOUREIRO, E.C.B. Desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção e diferenciação de categorias de Escherichia colidiarreogênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.77-84, 2010.

DELL'OMO, G.; MORABITO, S.; QUONDAM, R.; AGRIMI, U.; CIUCHINI, F.; MACRI, A.; CAPRIOLI, A. Feral pigeons as a source of verocytotoxin producing Escherichia coli. **Veterinary Record**, v. 142, n. 12, p. 309-310, 1998.

ESCOBAR, A. E. **Plano de educação ambiental para zoológicos**. Colômbia: Fundação Zoológica de Cali, 2000.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Diarrheagenic Escherichia coli. **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2002.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. **Diarrheagenic Escherichia coli**. 2011. Chap. 4A: bacteriological analytical [Manual on line]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 01 jan. 2016.

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 (Doctoral dissertation, **Universidade de São Paulo**, 2012).

FRANK, J. How the ribosome works. **American Science**, v. 86, p. 428-439, 1998.

FRIESEMA, I.; ZWALUW, K. V.; SCHURURMAN, T.; KOOISTRA-SMID, M.; FRANZ, E.; DUYNHOVEN, Y. V.; PELT, W. V. Emergence of Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 17, p. 26-32, 2014.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in Escherichia coli associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 169-182, 2002.

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO. **Relatório anual**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 2014. p. 11 -13.

GARCIA, D. P.; DUARTE, D. A. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 6, n. 1, p. 545-554, 2014.

GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella, v. 9, 2007.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 204-221, 2007.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **CAB International**, p. 672, 1994.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroagregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

HUANG, D. B; OKHUYSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.

HUBÁLEK, Z. Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review). **Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae**, v. 28, p. 1-74, 1994.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

JEANJEAN S. I.; ROGGENTIN P.; MIKOLEIT M.; GUIBOURDENCHE M.; PINNA E.; NAIR S.; FIELDS P. F.; WEILL F. X. Whitee Kauffmanne Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, p. 526-530, 2014. Supplement 2008 – 2010, n. 48.

KAHN, R. E.; MOROZOV, I.; FELDMAN, H.; RICHT, J. A. 6th International Conference on Emerging Zoonoses. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. s2, p. 2-31, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1 is located on a novel pathogenicity island. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 744-749, 2006.

LANG, A. L.; TSAI, Y. L.; MAYER, C. L.; PATTON, K. C.; PALMER, C. J. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 3145-3149, 1994.

LÁZARO, N. S.; REIS, E. M. F.; PEREIRA, C. S. P.; RODRIGUES, D. P. **Gênero Salmonella**: características epidemiológicas e laboratoriais. Rio de Janeiro: Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Bacterianas – Laboratório de Enterobactérias LRNCEB/LABENT /IOC /VP SRA/FIOCRUZ, 2008.

LILLEHAUG, A.; JONASSEN, C.M.; BERGSJØ, B.; HOFSHAGEN, M.; THARALDSEN, J.; NESSE, L.L.; HANDELAND, K. Screening of feral pigeon (*Columba livia*), mallard (*Anas platyrhynchos*) and graylag goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n. 4, p.193-202, 2005.

LOPES, L.; BOSA, C. R.; SILVA, J. D. Percepção ambiental dos visitantes do zoológico municipal de Curitiba-PR. **Monografias Ambientais**, v. 4, n. 4, p. 866-876, 2011.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A.; BUSATO, M. A. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas no Município de Chapecó-SC, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 20, n. 3, p. 401-407, 2011.

MATIAS, C. A. R. Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterianos em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no estado do Rio de Janeiro-Brasil: riscos para a saúde pública (Doctoral dissertation), 2014.

MATURANA, V. G.; PACE, F. D.; CARLOS, C.; MISTRETTA P. M.; AMABILE C. T.; NAKAZATO, G.; DIAS S. W. Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, n. 1, 2011.

McLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by

polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 4, p. 479-488, 2000.

MIRANDA, C.; LADENDORFF, N.; KNÖBL, T. Percepção da população sobre a participação dos pombos (*Columba livia domestica*) na transmissão de zoonoses. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 2, n. 1, p. 23-28, 2014.

MOSCHIONI, C.; FARIA, H. P.; REIS, M. A. S.; SILVA, E. U. Severe pneumonia due to *Chlamydia psittaci*. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 4, p. 219-222, 2001.

MOUTINHO, F. F. B.; ROCHA, M. R. D.; BORGES, F. V. B.; PEREIRA, A. G.; SERRA, C. M. B. Reclamações da comunidade à seção de controle de população animal do centro de controle de zoonoses de Niteroi, RJ, Brasil, no período de 2006-2010. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 26-31, 2013.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NIEWERTH, U.; FREY, A.; VOSS, T.; LE BOUGUÉNEC, C.; BALJER, G.; FRANKE, S.; SCHMIDT, M. A. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 143-149, 2001.

NOMISMA. Analisi dei rischi sanitari. In: _____. **Valutazione dei costi economici e sociali dei colombi in ambiente urbano**. Bologna: Nomisma: Società Economici S.p.a., 2003. cap. 4, p. 66-91.

NUNES, V. D. F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Revista O Biológico**, v. 65, p. 89-92, 2003.

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. In: Simpósio sobre a Biologia e o Manejo da Pomba-margosa, *Zenaida auriculata*, Assis, São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=192>. Acesso em: 2 fev. 2016.

OLIVEIRA, R. M. S.; SOUZA, M. S. B. Manejo e percepção ambiental no controle da superpopulação de *Columba livia* Gmelin, 1789 (Columbiformes: Columbidae) no Município de Campina Grande – PB. **Educação Ambiental em Saúde**, n. 48, 2014. Disponível em: <<http://revistaeea.org/pf.php?idartigo=1804>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

PARMA, A. E.; SANZ, M. E.; VINAS, M. R.; CICUTA, M. E.; BLANCO, J. E.; BOEHRINGER, S. I.; Blanco, M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 269-276, 2000.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol Lett**, v. 252, n. 1, p. 11-18, 2005.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus* neoformans nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 293-298, 2004.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; BLAKE, P. A. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE SALMONÉLOSE AVIÁRIA, 2011, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2011.

RUSSO T. A.; JOHNSON J. R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal Infectious Disease**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

SANCHES, L. A.; KNÖBL, T.; GOMES, M. S. G.; TEIXEIRA, R. H. F. Detecção molecular de patótipos de *Escherichia coli* em aves silvestres cativas do Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA USP, 22., 2014, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SICUSP, 2014.

SANTOS, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; SILVA, R. M.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 392-409, 2009.

SANTOS, I. O. C. **Isolamento de *Salmonella* spp. em pombos (*Columba livia*) no Distrito Federal – aspecto de relevância ao sistema de Vigilância em Saúde.** 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Anima) - Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SANTOS, T.; CROMBERG, V. V.; YOSHIDA, C. E.; FELIPPE, P. A. N.; SANTOS, E. F. Observações preliminares do forrageamento de pombos (*C. livia*) no Bosque dos Jequitibás, Campinas - SP. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLOGICOS, 12., 2003, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP., 2003. p.1-9.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N. A.; MELTON-CELSA, A. R.; SANCHES, M.; PERSSON, S.; O'BRIEN, A. D. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI A.; WIELER, L. H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1292-1297, 2008.

SCHULLER, M. Pombos urbanos – um caso de saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira do Controle de Contaminação**, v. 29, p. 32-37, 2005.

SCHULLER, M. **Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nos excretas do pombo doméstico (*Columba livia*).** Diss. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Prática de Saúde Pública, 2004.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 167, 1996.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 137-141, 2008.

SILVA, R. C. R.; MACIEL, W. C.; TEIXEIRA, C. R. S.; SALLES, R. P. R. O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 189-194, 2014.

SILVA, V. L.; NICOLI, J. R.; NASCIMENTO, T. C.; DINIZ, C. G. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility patterns. **Current Microbiology**, v. 59, p. 302-308, 2009.

SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS E AQUARIOS DO BRASIL (SZB). Grupo de trabalho em nutrição. **O comitê de nutrição da SZB**, 2016. Disponível em: <comitenutricaoazb.com.br>. Acesso em: 15 abr. 2016.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: University Press, 1997. p. 3-48.

TADDEI, C. R.; MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; MONTEMOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 2, p. 249-253, 2003.

TAKAHARA, D. T.; LAZERA, M. D. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; PAULA, D. A. J. D.; PAULA, C. R. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 371-376., 2013.

TASSI, V. M. Manual para Tratadores. Guarulhos: Secretaria do Meio Ambiente, 2008.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

UD-DIN, A.; WAHID, S. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1131-1138, 2014.

UGRINOVICH, A. L.; BLANCO, J.; BLANCO, M., BLANCO, J. E.; LEOMIL, L., DAHBI, G.; CASTRO, A. P. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; BRISSE, S. Guidelines for the validation and application of typing

methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. s3, p. 1-46, 2007.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 4-8, 2007.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Who's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths**. WHO, 2016. Disponível em: <[HTTP://WWW.WHO.INT/MEDIACEN TRE /NEWS/RELEASES /2015 /FOODBORNE-DISEASE-ESTIMATES/EN/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/)>. Acesso em: 10 fev. 2016.

WRAY, C.; WOODWARD, M. J. **Escherichia coli infections in farm animals**. In: SUSSMAN, M. (Ed) *Escherichia Coli: mechanisms of virulence*. Cambridge: Cambridge University, 1997, p. 49-84.