

ANDRÉ BECKER SIMÕES SAIDENBERG

**Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos
com diferentes manifestações clínicas**

São Paulo

2008

ANDRÉ BECKER SIMÕES SAIDENBERG

**Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos
com diferentes manifestações clínicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

São Paulo

2008

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.2078 FMVZ	<p>Saidenberg, André Becker Simões Detecção de fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i> isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas / André Becker Simões Saidenberg. – São Paulo : A. B. S. Saidenberg, 2008. 91 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.</p> <p>1. Aves silvestres. 2. Colibacilose. 3. <i>Escherichia coli</i>. 4. Psitacídeos. I. Título.</p>
----------------	--



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas”, protocolado sob o nº1486/2008, utilizando 500 (quinhentas) galinhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado “ad referendum”.

(We certify that the Research “Detection of *Escherichia coli* virulence factors isolated from psittacine birds with distinct clinical signs”, protocol number 1486/2008, utilizing 500 (five hundred) chickens, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 05 de dezembro de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAIDENBERG, André Becker Simões

Título: Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Gugu, Keko, Pepito, Lorel, Loreca, e tantos outros sem nome; que este trabalho seja útil para ajudar àqueles que têm voz, mas não são compreendidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Antonio José Piantino Ferreira pela orientação e voto de confiança.

À equipe do Zoológico de Sorocaba em especial Rodrigo Teixeira e tratadores.

À Terezinha Knöbl, pelo apoio durante a graduação e processamento de diversas amostras utilizadas nesse trabalho.

À Marta B. Guimarães e Lívia no Ambulatório de Aves.

À equipe do Projeto Arara-azul e Projeto Papagaio-verdadeiro e todos envolvidos nas coletas em especial Neiva Maria R. Guedes, Gláucia Helena F. Seixas, Tânia F. Raso, Karla Vanessa Barbosa, Mariângela Allgayer, Luís Fábio Silveira.

A Mariângela Allgayer pelas coletas no Criatório Asas do Brasil e Renato Severi Costa no Criatório Amazona Zotech.

À Claudete S. A. Ferreira pelo inestimável auxílio nas correções.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado (processo nº. 06/58552-5).

RESUMO

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas.** [Detection of *Escherichia coli* virulence factors isolated from psittacines with varied clinical signs]. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os fatores de virulência presentes em *Escherichia coli* (*E. coli*) patogênicas vêm sendo estudados em diversas espécies animais devido à importância de algumas cepas. Estas podem ser classificadas em sorotipos ou mais recentemente através de patotipos, de acordo com algumas técnicas de biologia molecular. Os patotipos mais conhecidos atualmente incluem as ETEC, STEC, EPEC, EIEC, UPEC e APEC. Vários patotipos encontrados causando doenças em animais têm também afetado gravemente seres humanos. Diversas espécies de aves também revelaram possuir patotipos de *E. coli* capazes de causar infecções zoonóticas. Além do aspecto zoonótico, infecções por bactérias Gram-negativas em aves silvestres têm especial importância, pois o Taxon *Psittacidae* contém muitas das espécies que mais estão ameaçadas de extinção, e sua manutenção e reprodução em cativeiro é comprometida por infecções bacterianas constantes, em especial por *E. coli*. Nesse estudo 174 amostras de *swabs* cloacais de aves sintomáticas e assintomáticas e de casos de necropsias foram testadas através da técnica da PCR para a detecção de fatores de virulência e a classificação em grupos filogenéticos. Detectaram-se 93 amostras (53.45%) positivas para associações de fatores de virulência, em especial para os patotipos EPEC, APEC e UPEC e a classificação de grande parte das amostras de necropsias no grupo filogenético A. O gene *iss* foi encontrado com maior frequência, sendo esta de 51.7% (n=30) nas aves sintomáticas e 23.2% (n=23) naquelas assintomáticas. Os resultados demonstraram serem de interesse não apenas com relação ao potencial zoonótico dessas aves em cativeiro, mas também para programas de conservação que visem à liberação de aves no meio selvagem.

Palavras-chave: Aves silvestres. Colibacilose. *Escherichia coli*. Psitacídeos.

ABSTRACT

SAIDENBERG, A. B. S. **Detection of *Escherichia coli* virulence factors isolated from psittacines with varied clinical signs.** [Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas] 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Virulence factors of pathogenic *Escherichia coli* (*E.coli*) have been studied in several animal species due the importance of certain strains. These strains can be classified in serotypes and more recently in pathotypes using molecular biology techniques. The mostly known pathotypes nowadays include ETEC, STEC, EPEC, EIEC, UPEC and APEC. Several pathotypes causing disease and found in animals are also linked to severe disease in humans. A number of bird species are also known to possess pathotypes able to cause zoonotic infections. Besides de zoonotic aspect, infections by Gram-negative bacteria have a special importance as the Taxon *Psittacidae* includes many of the most threatened species and their maintenance in captivity is compromised by constant bacterial infections, especially *E.coli*. In this study, 174 samples from cloacal swabs of asymptomatic and symptomatic birds and necropsy cases were tested employing the PCR technique to detect virulence factors and to classify among phylogenetic groups. Ninety three positive samples were detected for virulence factors associations, mostly EPEC, APEC and UPEC, and most of the necropsy samples for the phylogenetic group A. The *iss* gene was detected with a higher frequency in symptomatic birds (51.7%, n=30) and 23.2%, (n=23) in asymptomatic ones. The results reveal to be of interest not only to the zoonotic potential of the isolates but also for conservation programs that intend to release these birds into the wild.

Keywords: Colibacillosis. *Escherichia coli*. Psittacines. wild birds.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Aranda et al. (2007).....	43
Quadro 2 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Wieler et al. (1996).....	44
Quadro 3 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Franke et al. (1994).....	44
Quadro 4 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Aranda et al. (2007).....	45
Quadro 5 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Janssen et al. (2001).....	46
Quadro 6 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Yamamoto et al. (1995).....	47
Quadro 7 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Ewers et al. (2005).....	47
Quadro 8 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Aranda et al. (2007).....	48
Quadro 9 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Aranda et al. (2007).....	49
Quadro 10 - Pares de <i>primers</i> utilizados segundo Clermont et al. (2000).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras isoladas de <i>swabs</i> de aves sintomáticas.....	54
Tabela 2 - Amostras isoladas de <i>swabs</i> de aves assintomáticas.....	57
Tabela 3 - Amostras isoladas de necropsias.....	63
Tabela 4 - Grupos filogenéticos detectados nas amostras isoladas de necropsias.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	grama
<i>g</i>	gravidade terrestre
HCl	ácido clorídrico
M	molar
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
µM	micromolar
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
Proj Arara az	Projeto Arara-azul
Proj papag	Projeto Papagaio-verdadeiro
rpm	rotações por minuto
s	segundos
TE	tampão Tris-EDTA
U	unidade
X	vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	menos
° C	graus Celsius
+	mais
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	33
3	OBJETIVOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
4.2	CULTURA BACTERIANA E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA.....	39
4.3	CONTROLES POSITIVOS.....	40
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA.....	40
4.5	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE EPEC.....	43
4.5.1	PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE <i>EAE</i>	43
4.5.2	PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE <i>BFP</i>	43
4.5.3	PCR PARA A DETECÇÃO DO PLASMÍDIO <i>EAF</i>	44
4.6	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE STEC.....	44
4.6.1	PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE <i>STX1/2</i>	45
4.6.2	PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE <i>HLYEHEC</i>	45
4.7	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE APEC E UPEC.....	46
4.8	PCR PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA <i>ISS</i> , <i>TSH</i>	47
4.9	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ETEC.....	48
4.10	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE EIEC.....	49
4.11	DETECÇÃO DO <i>AMPLICON</i>	49
4.12	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DE <i>E. COLI</i> SEGUNDO GRUPOS FILOGENÉTICOS.....	49
5	RESULTADOS	52
5.1	RESULTADOS DA PCR.....	52
6	DISCUSSÃO	66
6.1	EPEC.....	66
6.2	STEC.....	68
6.3	APEC.....	69
6.4	EIEC.....	73
6.5	ETEC.....	73
6.6	RISCOS PARA A REINTRODUÇÃO DE AVES NA NATUREZA E SOBRE A IMPORTÂNCIA DO ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	73
6.7	AMOSTRAS NEGATIVAS QUE NÃO EXPRESSARAM OS FATORES DE VIRULÊNCIA PESQUISADOS.....	76
6.8	GRUPOS FILOGENÉTICOS.....	77
6.9	ESTRESSE.....	72
7	CONCLUSÕES	82
8	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, constando como o terceiro país do mundo em maior número de espécies de aves (BRASÍLIA, 2002), sendo 1524 espécies residentes e 153 migratórias. Dentre estes números destacam-se os psitacídeos, contendo a maior quantidade em espécies (n=80) em comparação a qualquer país no mundo (SICK, 1997).

A Organização Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) classifica as espécies conforme o grau de vulnerabilidade e risco de extinção no habitat natural. Do total de 80 espécies endêmicas de psitacídeos, 13 são classificadas como vulneráveis a criticamente ameaçadas, sendo que para inúmeras destas a quantidade de indivíduos vêm sendo reduzida contínua e inexoravelmente, mesmo com iniciativas para sua conservação no habitat natural e procriação em cativeiro, como no caso da Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*), criticamente ameaçada (SNYDER et al., 2000).

A identificação dos agentes etiológicos e do risco que representam para coleções de animais em cativeiro torna-se extremamente útil, pois permite intervir sobre os fatores envolvidos, diminuindo conseqüentemente a chance de aparecimento de doenças e acabando por contribuir para a conservação de espécies ameaçadas (GOMES, 2002).

Um grande exemplo do problema enfrentado na conservação de espécies de psitacídeos criticamente ameaçados é o Periquito-das-Ilhas-Maurício (*Psittacula eques*), cuja população estimada em 1986 se restringia de 8 a 12 indivíduos na natureza. Esforços no sentido de promover a reprodução em cativeiro foram bem sucedidos havendo o nascimento de 15 aves no período de 1987 a 1993, no entanto 12 dessas vieram à óbito por infecções causadas por bactérias Gram-negativas cuja origem pôde ser traçada pela contaminação do suprimento de água. Após a correção do manejo sanitário, a população em cativeiro aumentou significativamente, permitindo um

programa extremamente bem sucedido de reintrodução da espécie na natureza (GREENWOOD, 1996).

Escherichia coli (*E.coli*) é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae* sendo por muito tempo considerada como um habitante comensal da microbiota entérica de diversas espécies animais, sem grande potencial patogênico. Essa visão mudou progressivamente ao se reconhecerem diversas afecções entéricas e extra-intestinais causadas por *E. coli* de sorotipos específicos e possuindo diversos fatores de virulência característicos (SUSSMANN, 1997).

Cepas de *E.coli* são freqüentemente classificadas através dos sorotipos determinados pelos antígenos somático (O), capsular (K), flagelar (H) e pili (F) (BARNES et al., 2004). Progressos realizados nas técnicas de biologia molecular permitiram um enorme avanço para também classificar em diferentes patotipos devido à detecção de fatores de virulência (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Patotipos tais como EPEC (*E.coli* enteropatogênica), ETEC (*E.coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), STEC (*E.coli* produtora de toxina tipo *Shiga*), EaggEC (*E.coli* enteroagregativa), UPEC (*E.coli* uropatogênica), NMEC (*E.coli* causadora de meningite neonatal), APEC (*E.coli* patogênica aviária) (FERREIRA; KNÖBL, 2000) foram estudados surgindo novas classificações conforme os vários fatores de virulência descobertos em diferentes espécies animais.

Os fatores de virulência de *E.coli* conhecidos incluem a capacidade da bactéria em expressar adesinas; a produção de colicinas; aerobactina e hemolisinas; presença de cápsula; produção de citotoxinas e enterotoxinas; capacidade de invadir tecidos e resistir aos fatores séricos inibitórios do hospedeiro (SUSSMAN, 1997). Alguns genes localizados em plasmídeos ou nos cromossomos são responsáveis pela codificação de fatores de virulência. No cromossomo, estes determinantes estão organizados em grandes fragmentos de DNA, denominados ilhas de patogenicidade (PAI) (HACKER et al., 1997). A presença destes fatores de virulência permite que a bactéria resista aos mecanismos de defesa do hospedeiro (específicos e inespecíficos), desencadeando o processo de doença (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

As cepas descritas como ETEC são conhecidas por causarem a chamada “diarréia dos viajantes”, produzindo as exotoxinas termo-estáveis (ST - subdividida em Sta e STb) e termo-lábeis (LT) que levam a uma diarréia aquosa e profusa (SUSSMANN, 1997).

Em contrapartida as EIEC possuem um grande plasmídeo (*ipaH*) que contém genes que permitem a invasão de células da mucosa intestinal causando grave disenteria de maneira similar a *Shigella* spp. (SUSSMANN, 1997).

O patotipo UPEC, o maior responsável pelas infecções urinárias em humanos, se caracteriza por possuir a fímbria P codificada pelo gene *pap*, fímbria S (gene *sfa*), hemolisina (gene *hly*), aerobactina (gene *iuc*) e fator citotóxico necrotizante (gene *cnf1*), entre outros fatores de virulência (SUSSMANN, 1997).

Adesinas fimbriais P foram inicialmente descritas em linhagens de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário de humanos (CAMPOS, 2006), contudo, cepas de isolados de APEC também apresentam o gene responsável por codificar essa fímbria. As funções da fímbria P em aves de produção são geralmente relacionadas à capacidade de aderir a órgãos internos e proteção contra heterófilos (JANSSEN et al., 2001).

A fímbria S também é encontrada em casos de meningite e *sepsis* neonatal em humanos e avaliações laboratoriais determinaram a sua capacidade de se aderir ao epitélio do plexo coróide, ventrículos cerebrais e endotélio vascular de ratos (SUSSMANN, 1997), havendo também sua detecção em casos de APEC em aves de produção.

Muitas bactérias patogênicas com capacidade para invasão desenvolveram afinidade por sistemas de aquisição de ferro que podem competir com os sideróforos do hospedeiro tais como a transferrina e conseqüentemente favorecer a multiplicação em ambientes com pequena quantidade de ferro disponível (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

A aerobactina é um sideróforo de origem bacteriana codificada pelo gene *iuc* e encontrada em grande parte das cepas de *E.coli* mais virulentas e juntamente com a alfa-hemolisina (gene *hlyA* causando lise de hemácias) agem como mecanismos para a aquisição de ferro em meios com baixa concentração deste íon (SUSSMANN, 1997).

O fator citotóxico necrotizante (codificado pelo gene *cnf1*) é uma toxina capaz de causar a formação de células gigantes, em cultivos celulares, e encontrado em casos de diarreia de animais e humanos. Seu achado também é relatado em casos de APEC com diferentes manifestações clínicas (JANSSEN, et al., 2001; KNÖBL, 2005).

As infecções por APEC em aves de produção causam doenças respiratórias, poliserosite fibrinosa e colisepticemia, sendo enterites bastante raras (BARNES et al, 2004). Em oposição a esse fato, nas aves exóticas/silvestres granívoras e frugívoras, *E. coli* é uma das causas mais freqüentes de afecções entéricas (FIENNES, 1982). As APEC possuem fatores de virulência em comum com UPEC tais como as adesinas P e S, aerobactina e toxina CNF. Incluem-se nas APEC outros fatores comumente detectados tais como hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*) e capacidade de resistência a fatores séricos (*iss*), entre outros. Contudo, os fatores de virulência de APEC ainda não foram completamente esclarecidos (DUGUID et al., 1994).

O gene *tsh* codifica a produção de uma proteína auto-transportadora que parece ter similaridade a uma subclasse da família de proteases do tipo IgA, estando envolvida em mecanismos de aderência ao trato respiratório de aves de produção (DOZOIS, et al., 2000).

Em adição ao seu papel em potencial como adesina, alguns trabalhos sugerem que a proteína produzida pelo gene *tsh* pode agir como protease em substrato específico dos sacos aéreos, mas que não é necessária para a infecção generalizada subsequente (DOZOIS et al., 2000).

A função do gene *iss* está comprovadamente relacionada à resistência sérica em casos de APEC (MELLATA et al., 2003) e alguns trabalhos também sugerem a

participação do gene *iss* encontrado em maior frequência em casos clínicos do que nas amostras fecais de galinhas assintomáticas (MCPEAKE et al., 2005).

As amostras de *E. coli* caracterizadas como AEEC (*attaching and effacing E. coli*) possuem a capacidade de causar lesões na mucosa intestinal de humanos e de animais levando a diarreia. A ocorrência de lesões do tipo *attaching/effacing* (A/E) é iniciada pela ligação íntima da bactéria aos enterócitos a qual é mediada pela intimina, uma adesina codificada pelo gene *eae* (NATARO; KAPER, 1998).

Os genes responsáveis pelas lesões do tipo A/E estão localizados no assim chamado *locus of enterocyte effacement* (LEE), sendo que a ilha de patogenicidade do LEE foi associada com patótipos tais como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC) (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas de EPEC são classificadas em típicas contendo o plasmídeo para o fator de aderência de EPEC (EAF) e o pili *bfp* (*bundle forming pili*), sendo este último responsável por mediar o primeiro contato da bactéria com a célula do hospedeiro. As cepas atípicas são negativas para o fator EAF e o *bfp* (TRABULSI et al., 2002).

E. coli produtoras de toxinas *Shiga* (STEC) produzem as verocitotoxinas (*Stx1*, *Stx2*) e possuem plasmídios que codificam a produção de enterohemolisinas (*hlyEHEC*), sendo que estas cepas são responsáveis pela ocorrência de colite hemorrágica e pela síndrome urêmica hemolítica (HUS) em humanos (NATARO; KAPER, 1998).

Os bovinos foram identificados como os reservatórios naturais de STEC e de outras *E. coli* produtoras de toxinas (WELLS et al., 1991; BLANCO et al., 2001) e com os surtos relacionados ao consumo de carne mal cozida contaminada com o sorotipo O157:H7 (RILEY et al., 1983), tornaram as toxinfecções humanas por *E. coli*, a denominada “doença do hambúrguer”, difundidas pela mídia e entre a opinião pública.

Outras espécies animais tais como cães (BEUTIN et al., 1993; NAKAZATO et al., 2004; KRAUSE et al., 2005), gatos, suínos, caprinos (BEUTIN et al., 1993), eqüinos (TREVINA et al., 1996), galinhas (KRAUSE et al., 2005), pombos (DELL’OMO et al.,

1998; SCHMIDT et al., 2000), gaivotas (KOBAYASHI et al., 2002), e coelhos (ROBINS-BROWNE et al., 1994; PENTEADO et al., 2002), vêm desde então sendo identificadas como possíveis fontes de infecção de *E. coli* patogênicas para humanos através da detecção de diversos fatores de virulência específicos.

A determinação em grupos filogenéticos de *E. coli* também tem sido utilizada por alguns pesquisadores para diferenciar linhagens extra-intestinais e virulentas de *E. coli* (grupos B2 e D) e linhagens comensais (grupos A e B1) utilizando a PCR *multiplex* para a detecção dos genes *chuA* (gene de transporte heme), *yja* (gene de função desconhecida de *E. coli* K12) e *Tsp.E4C2* (fragmento de DNA de STEC) (CLERMONT et al., 2000), podendo ser útil na classificação de cepas de origem aviária (CAMPOS, 2006).

Além do aspecto zoonótico de certas cepas de *E. coli* já identificadas como possuidoras de potencial patogênico tanto para mamíferos como para aves (DELL'OMO et al., 1998; SCHREMMER et al., 1999; SCHMIDT et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2002; KRAUSE et al., 2005), pode-se citar a grande importância de infecções por *E. coli* na conservação de psitacídeos em cativeiro, já que grande parte das sintomatologias entéricas e casos de infecção sistêmica envolvem Gram-negativas, em especial *E. coli*. A questão de considerar estes isolados como patógenos primários ou oportunistas e recomendar o tratamento com antibiótico terapia continua sendo uma questão de grande controvérsia na medicina veterinária de aves silvestres, pois nesta situação torna-se difícil estabelecer até que ponto estes microrganismos podem ser considerados patogênicos em aves clinicamente saudáveis (SAIDENBERG; KNÖBL, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Bangert et al. (1988) estabeleceram que a microbiota normal da maioria das espécies de psitacídeos saudáveis em cativeiro é composta essencialmente por microrganismos Gram-positivos como *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Em estudo realizado na Europa, Dorrestein et al. (1985) analisaram 80 amostras de fezes e 466 necropsias de psitacídeos, determinando que qualquer bactéria Gram-negativa cultivada das fezes poderia ser considerada um patógeno. Neste trabalho *E.coli* foi isolada em 41% das amostras de fezes e de 29% das necropsias, sendo que grande parte das necropsias (45%) resultaram em culturas puras de *E.coli* e 30% destas foram positivas em isolamento de órgãos.

Godoy (2002) relatou dois casos, envolvendo um Periquito-verde (*Brotogeris tirica*) e uma Jandaia-coquinho (*Aratinga aurea*), em que o principal achado macroscópico em necropsia foi uma enterite necrótica severa indicativa de cepas enteropatogênicas de *E. coli* com alto grau de virulência.

Demonstrando a importância de infecções por *E. coli* em relação a uma espécie ameaçada como a Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), Panigraphy e Harmon (1985) relataram um caso de colibacilose no qual no exame necroscópico observou-se hiperemia generalizada de órgãos internos, hemorragias no miocárdio, serosa de ventrículo, intestinos e na gordura cavitária. Material caseoso preenchia o lúmen intestinal e microscopicamente, a mucosa estava ulcerada e a serosa necrosada. Culturas bacterianas de punção cardíaca, fígado e intestinos resultaram em culturas puras de *E.coli*.

Um estudo realizado com o objetivo de tentar estabelecer a microbiota de psitacídeos em cativeiro envolveu a coleta de *swabs* de cloaca de 506 aves, cujo

principal requisito foi a ausência de sintomatologia aparente. Foram realizados exames coproparasitológicos, hemogramas completos e análises bioquímicas séricas para se certificar de que as aves não apresentavam nenhuma alteração fisiológica. Os resultados das culturas revelaram que 31% dos psitacídeos possuíam *E.coli* no trato intestinal, especialmente o gênero *Cacatua* (60%) em comparação com todas as outras espécies (18%). Os autores concluíram que devido às aves estarem se reproduzindo e tendo crias bem sucedidas sem mostrar sinais de doenças, as cepas *E.coli* não deveriam ser patogênicas. Como não se pôde discriminar se *E.coli* isoladas seriam normais ou conseqüência das condições de cativeiro, estudos envolvendo populações no habitat selvagem deveriam ser realizados para se determinar a verdadeira microbiota normal destas aves (FLAMMER; DREWES, 1988).

No Brasil, Abilleira et al. (2006) através do método de coloração de Gram obtiveram um baixo percentual (1,7%) de bacilos Gram-negativos ao estudar amostras obtidas de fezes de filhotes de Araras-azuis, este resultado demonstrou estar em concordância ao descrito no Brasil em psitacídeos mantidos em cativeiro com manejo sanitário adequado (MATTES et al., 2005).

Em trabalho similar com filhotes de Araras-azuis de vida livre no Pantanal, Chaves et al. (2000) identificaram diversas enterobactérias, incluindo *E. coli* na microbiota oral e cloacal de 4 filhotes de Araras-azuis assintomáticos e como resultado os autores concluíram que as aves deveriam ser portadoras assintomáticas deste agente.

Mais recentemente, Gray et al. (2007), coletaram *swabs* cloacais de 4 araras adultas mantidas em cativeiro e de outras 4 encontradas na reserva natural de Tambopata, na Amazônia Peruana. Após utilizarem a técnica de seqüenciamento da região 16S do RNA ribossômico microbiano clonado, identificaram diversas espécies de microrganismos, incluindo Gram-negativas como *Pantoea agglomerans* (anteriormente classificada como *Enterobacter agglomerans*), *Stenotrophomonas* spp. e *E.coli*. Porém, nenhuma das aves de vida livre foi positiva para o gênero *Escherichia*. Os autores

estabeleceram que o pequeno número de amostras não foi conclusivo e outros estudos estão sendo realizados.

Estudos envolvendo a detecção de fatores de virulência de *E.coli* em animais selvagens são raros no Brasil. Como exemplo, pesquisas envolvendo a detecção de *E.coli* enteropatogênicas em primatas neotropicais detectaram a presença de EPEC típicas e atípicas em casos clínicos de diarreia e prostração, assim como, em animais assintomáticos, sendo que diversos animais eram mantidos como animais de estimação (CARVALHO, et al., 2003).

Schremmer et al. (1999) pesquisaram a presença dos genes responsáveis pela produção de toxinas (*stx1* e *stx2*), intimina (*eae*), *bfp* e enterohemolisina (*HlyEHEC*) pela técnica de PCR em psitacídeos sintomáticos (afecções entéricas), assintomáticos e em casos de necropsia. Seus resultados confirmaram a presença de um percentual de 6,8% de aves positivas para o gene *eae* em casos de envolvimento entérico (sendo que quatro das 7 amostras positivas puderam ser classificadas como EPEC). Os autores também demonstraram o envolvimento destes agentes causando graves enterites e posterior septicemia nos psitacídeos estudados e puderam definir estas aves como potenciais fontes de infecção para humanos. Dentre os resultados também se observou a ausência de toxinas e enterohemolisinas nas cepas isoladas e a presença de EPEC atípicas (aEPEC), pois o gene *bfp* não foi detectado.

3 OBJETIVOS

- Isolar amostras de *E. coli* em psitacídeos apresentando diarreia, septicemia e de aves clinicamente saudáveis.
- Detectar fatores de virulência presentes nas amostras isoladas.
- Correlacionar os fatores de virulência detectados com os patótipos de *E. coli* (EPEC, ETEC, STEC, EIEC, APEC, UPEC).
- Determinar o agrupamento filogenético dos isolados de necropsias.
- Correlacionar os fatores de virulência com a sintomatologia clínica das aves.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Um total de 34 amostras de *E.coli* foi coletado de aves do Parque Zoológico Municipal de Sorocaba “Quinzinho de Barros” através de *swabs* cloacais de aves assintomáticas, sintomáticas (prostração, diarreia, regurgitação) e de órgãos, na realização de necropsias.

Outras 85 amostras de *E.coli* foram coletadas no Ambulatório de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) utilizando *swabs* cloacais de aves sintomáticas, assintomáticas e fragmentos de órgãos de necropsias.

Vinte e cinco amostras de *swabs* cloacais de aves assintomáticas foram coletadas em um criatório de aves silvestres. E 40 amostras foram obtidas de filhotes de vida-livre assintomáticos do Projeto Papagaio-verdadeiro e Projeto Arara-azul.

Perfazendo 174 amostras no total sendo que 100 amostras provieram de aves assintomáticas, 60 de aves sintomáticas e 14 de necropsias.

4.2 Cultura bacteriana e identificação bioquímica

Os *swabs* cloacais e fragmentos de órgãos foram armazenados em meio de transporte (meio de Stuart, DIFCO®) e mantidos a 4°C até o processamento. Em seguida, as amostras foram incubadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, DIFCO®) a

37°C por 24 horas, seguidas de subcultivo em ágar MacConkey (DIFCO®) a 37°C por 24 horas, identificando-se as colônias isoladas através da série bioquímica EPM-Mili-Citrato de Simmons (FALCÃO, 2000).

4.3 Controles positivos

Os controles positivos para os fatores de virulência a serem pesquisados foram obtidos da coleção em estoque do LABOR (Laboratório de Ornitopatologia - FMVZ USP) e do Departamento de Microbiologia da UNIFESP (Profa. Dra. Tânia T. A. Gomes).

4.4 Extração do DNA

Para a obtenção do material genético utilizou-se o método de Boom et al. (1990) com pequenas modificações.

Os reagentes utilizados nesse método de extração foram compostos por:

Tampão de Lise:

- Isotiocianato de guanidina – 120 gr.
- Triton 100X – 1mL
- EDTA 0.5 M (pH 8.0) – 8,8 mL.
- Tris-HCl 0.1 M (pH 6.4) – 111.2 mL.

Tampão de Lavagem:

- Isotiocianato de guanidina – 120 gr.
- Tris-HCl 0.1 M (pH 6.4) – 100 mL.

Solução Carreadora:

- Sílica – 1gr.
- Água destilada – 5 mL.
- HCl 37% - 50 µL.

Tampão de Eluição:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).
- 1 mM EDTA.

Protocolo de extração:

A colônia selecionada foi ressuspensa em 200 µL de água ultra-pura autoclavada em microtubo de 1.5 mL, adicionando-se 1 mL de Tampão de Lise e 40µL de solução carreadora. Em seguida, agitou-se por 30 segundos e deixou-se incubar por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 g por 90 segundos. Removeu-se o sobrenadante sem tocar no *pellet* e adicionou-se 0.5 mL de Tampão de Lavagem. Agitou-se por 15 segundos em *vortex* e novamente centrifugou-se por 12000 g por 90 segundos. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento de lavagem mais uma vez. Descartou-se o sobrenadante novamente e adicionou-se 0.5 mL de Etanol (70%) agitando-se por 15 segundos em *vortex* e centrifugando-se a 12000 g por 90 segundos. Repetiu-se o procedimento mais uma vez. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 0.5 mL de Acetona e agitou-se por 15 segundos em *vortex* centrifugando-se a 12000 g por 90 segundos. O sobrenadante foi descartado e deixou-se secar o *pellet* em banho-seco. Adicionou-se 150 µL de Tampão de Eluição seguindo-se de agitação

em *vortex* por 60 segundos. Incubou-se a 56°C por 10 minutos em banho-seco. Agitou-se em *vortex* por 60 segundos e centrifugou-se a 12000 g por 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante contendo o DNA para novos tubos armazenando-se o material extraído a -20°C.

4.5 Reação em cadeia pela polimerase para a detecção dos fatores de virulência de EPEC

Para a realização da PCR utilizaram-se os seguintes protocolos segundo os diversos autores.

4.5.1 PCR para a detecção do gene *eae*

Primeiramente utilizou-se como triagem inicial das amostras para o gene *eae* os *primers* e protocolo de reação para um volume final de 25 µL descrito por Aranda et. al (2007). (Quadro 1).

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>eae-S</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917 pb
<i>eae-AS</i>	CGAGACGATACGATCCAG	

Quadro 1 - Pares de primers utilizados segundo Aranda et al. (2007)

Após a triagem inicial, as amostras positivas para o gene *eae* foram também examinadas em uma PCR para os genes *Stx1/2*, *HlyEHEC* para identificá-las como STEC (protocolo a seguir), segundo Aranda et al. (2007), e para os genes do plasmídeo EAF (FRANKE et al., 1994), e gene *bfp* segundo Wieler et al. (1996) que caracterizariam os positivos como EPEC (típica ou atípica).

4.5.2 PCR para a detecção do gene *bfp*

Utilizou-se o protocolo e ciclos para a reação da PCR para o gene *bfp* descrito por Wieler et al. (1996) (Quadro 2).

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>bfp-S</i>	GAT TGA ATC TGC AAT GGT GC	570 pb
<i>bfp-AS</i>	GGA TTA CTG TCC TCA CAT AT	

Quadro 2 - Pares de primers utilizados segundo Wieler et al. (1996)

4.5.3 PCR para a detecção do plasmídeo *EAF*

Utilizou-se o protocolo e ciclos para a reação da PCR para o gene do plasmídeo *EAF* segundo Franke et al. (1994) (Quadro 3).

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>EAF-S</i>	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A	397 pb
<i>EAF-AS</i>	TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA	

Quadro 3 - Pares de primers utilizados segundo Franke et al. (1994)

4.6 Reação em cadeia pela polimerase para a detecção dos fatores de virulência de *S*

Para realização da PCR para STEC utilizou o seguinte protocolo:

4.6.1 PCR para detecção do gene *stx1/2*

Utilizou-se o protocolo e ciclos para a reação da PCR segundo Aranda et al. (2007) (Quadro 4).

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
STX1/2-S	GAGCGAAATAATTTATATGTG	518 pb
STX1/2-AS	TGATGATGGCAATTCAGTAT	

Quadro 4 - Pares de primers utilizados segundo Aranda et al. (2007)

4.6.2 PCR para a detecção do gene *HlyEHEC*

Utilizou-se o protocolo e ciclos para a reação da PCR segundo Janssen et al. (2001) (Quadro 5).

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>HlyEHEC-S</i>	GAGCGAGCTAAGCAGCTTG	889 pb
<i>HlyEHEC-AS</i>	CCTGCTCCAGAATAAACCCACA	

Quadro 5 - Pares de primers utilizados segundo Janssen et al. (2001)

4.7 Reação em cadeia pela polimerase para detecção dos fatores de virulência de APEC e UPEC

Empregou-se o PCR *multiplex* utilizando-se o protocolo de reação e *primers* descritos por Yamamoto et al. (1995):

(continua)

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>iucD-S</i>	TACC GGA TTG TCA TAT GCA GAC CGT	602 pb
<i>iucD-AS</i>	AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	
<i>cnf1-S</i>	AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAG GAG	498 pb
<i>cnf1-AS</i>	CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T	
<i>sfa-S</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	410 pb
<i>sfa-AS</i>	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	

(conclusão)

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>papEF-S</i>	GCA ACA GCA ACG CTG GTT GCA TCA T	336 pb
<i>papEF-AS</i>	AGA GAG AGC CAC TCT TAT ACG GAC A	
<i>hlyA-S</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177 pares de base
<i>hlyA-ASs</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	

Quadro 6 - Pares de primers utilizados segundo Yamamoto et al. (1995)

4.8 PCR para a detecção dos fatores de virulência *iss* e *tsh*

Para a detecção dos genes *iss* e *tsh* utilizou-se o protocolo descrito por Ewers et al. (2005) (Quadro 7).

(continua)

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>iss-S</i>	ATCACATAGGATTCTGCCG	309 pb
<i>iss-AS</i>	CAGCGGAGTATAGATGCCA	

(conclusão)

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>tsh-S</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824 pb
<i>tsh-AS</i>	CTTCCGATGTTCTGAACGT	

Quadro 7 - Pares de primers utilizados segundo Ewers et al. (2005)

4.9 Reação em cadeia pela polimerase para a detecção dos fatores de virulência de ETEC

Para a detecção dos genes *LT* e *ST* utilizou-se o protocolo descrito por Aranda et al. (2007) (Quadro 8).

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>ST-S</i>	ATTTTTMTTCTGTATRTCTT	190 pb
<i>ST-AS</i>	ATTTTTMTTCTGTATRTCTT	
<i>LT-S</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC	450 pb
<i>LT-AS</i>	CGGTCTCTATATCCCTGTT	

Quadro 8 - Pares de primers utilizados segundo Aranda et al. (2007)

4.10 Reação em cadeia pela polimerase para detecção dos fatores de virulência de EIEC

Para detecção do gene *ipaH* utilizou-se o estudo descrito por Aranda et al. (2007) (quadro 9).

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>ipaH-S</i>	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	600 pb
<i>ipaH-AS</i>	G CCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	

Quadro 9 - Pares de primers utilizados segundo Aranda et al. (2007)

4.11 Detecção do amplicon

A detecção do produto amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1.5% contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, identificando os fragmentos de interesse utilizando-se o marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen®).

4.12 Reação em cadeia pela polimerase para a detecção de *E.coli* segundo os grupos filogenéticos

Para detecção dos genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4C2* utilizou-se o protocolo descrito por Clermont et al. (2000) e obedecendo a sua classificação: *chuA*+/*yja*+ : grupo B2; *chuA*+;*yja*- : grupo D; *chuA*-/*tspE4.C2*+ : grupo B1; *chuA*-/*tspE4.C2*- : grupo A (Quadro 10).

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
<i>chuA</i> -S	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279 pb
<i>chuA</i> -AS	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i> -S	TGAAGTGTCAGGAGATGCTG	211 pb
<i>yjaA</i> -AS	ATGAAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>tspE4C2</i> -S	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152 pb
<i>tspE4C2</i> -AS	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Quadro 10 - Pares de primers utilizados segundo Clermont et al. (2000)

5 RESULTADOS

Obtiveram-se os seguintes resultados com as amostras testadas:

5.1 Resultados da PCR

Como apresentado nas tabelas 1 a 4 a seguir diversos fatores de virulência puderam ser detectados nas amostras analisadas.

Encontraram-se 7 amostras positivas para o gene *eae* e *bfp*, sendo estas caracterizadas como EPEC típicas (NATARO; KAPER, 1998), mesmo havendo a ausência de amplificação para o plasmídeo EAF.

Nenhuma das amostras foi caracterizada como STEC, ETEC, ou EIEC.

Das sete aves positivas, três apresentavam grave quadro de enterite e prostração (5.1% do total de sintomáticos) e as restantes eram clinicamente assintomáticas (4.4% do total de assintomáticos). Não foram encontrados esses genes nas amostras de necropsias.

Um grande número de amostras foi positiva para fatores de virulência comuns a APEC/UPEC tanto em aves sintomáticas (tabela 1) como assintomáticas (tabela 2). Para o gene *iss*, das aves sintomáticas 51.7% (30 amostras) foram positivas, daquelas assintomáticas 23.2% (23 amostras) e nenhuma de necropsia (tabela 3).

Para o gene *tsh* 8.6% (5 amostras) foram encontrados nas aves sintomáticas, 1% (1 amostra) nas assintomáticas e nenhuma dos casos de necropsia.

O gene *sfa* foi detectado em 3.4% (2 amostras) das aves sintomáticas, em 2% (2 amostras) das aves assintomáticas, e em nenhum dos isolados de necropsia.

O gene *pap* foi encontrado em 3.4% das amostras (2 amostras) sintomáticas e em nenhuma das amostras de aves assintomáticas e de necropsias.

O gene *hlyA* foi positivo em 3.4% das amostras (2 amostras) e em nenhuma das assintomáticas e de necropsias.

O gene *iuc* foi positivo em 12% dos isolados (7 amostras), em 10.1% (10 amostras) nos isolados de aves assintomáticas e em 7.1% das amostras de necropsias (1 amostra).

O gene *cnf1* foi encontrado em 3.4% das amostras de aves sintomáticas (2 amostras), em 2% das amostras de aves assintomáticas (2 amostras) e em nenhuma das de necropsias.

O perfil de fatores de virulência associados mais frequentemente aos casos com sinais clínicos foi o *iss/iuc* com 6 amostras (10.3%), seguido de 3 amostras para os genes *iss/iuc/tsh* (5.1%) e 2 amostras para os genes *sfa/pap/iss/cnf1* (3.4%).

A PCR para os grupos filogenéticos identificou uma amostra para o grupo D e as restantes (13 amostras) para o grupo A. Estes resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 1 - Amostras isoladas de swabs de aves sintomáticas

(continua)

Amostra	origem	Espécie	eae	bfp	EAf	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
1	Ambulatório	<i>Aratinga solstitialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	Ambulatório	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	Ambulatório	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
7	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	Ambulatório	<i>Cacatua alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Ambulatório	<i>Amazona brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Ambulatório	<i>Melopsittacus undulatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Ambulatório	<i>Amazona brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Ambulatório	<i>Cacatua molluccensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Ambulatório	<i>Cacatua molluccensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
15	Ambulatório	<i>Pyrrhura frontalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	Ambulatório	<i>Pyrrhura frontalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Ambulatório	<i>Melopsittacus undulatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Sorocaba	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-

Tabela 1 - Amostras isoladas de swabs de aves sintomáticas

(conclusão)

Amostra	origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
45	Ambulatório	<i>Amazona vinacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
46	Ambulatório	<i>Amazona brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
47	Ambulatório	<i>Cacatua alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
48	Ambulatório	<i>Ara ararauna</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Ambulatório	<i>Cacatua alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
50	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
53	Criadouro	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
54	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55	Ambulatório	<i>Amazona brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
56	Ambulatório	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	Ambulatório	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
59	Ambulatório	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
60	Ambulatório	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Amostras isoladas de swabs de aves assintomáticas.

(continua)

Amostra	Origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
61	Sorocaba	<i>Amazona festiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
62	Ambulatório	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	Sorocaba	<i>Ara rubrogenys</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	Sorocaba	<i>Guaruba guarouba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	Ambulatório	<i>Amazona rhodocorytha</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Ambulatório	<i>Amazona rhodocorytha</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
70	Sorocaba	<i>Alipiopsitta xanthops</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	Sorocaba	<i>Amazona farinosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
74	Sorocaba	<i>Guaruba guarouba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	Ambulatório	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
76	Ambulatório	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
77	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	Ambulatório	<i>Brotogeris tirica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Amostras isoladas de swabs de aves assintomáticas.

(continua)

Amostra	Origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
97	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
98	Criadouro	<i>Amazona vinacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	Criadouro	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
102	Criadouro	<i>Amazona vinacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	Criadouro	<i>Amazona vinacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	Ambulatório	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
107	Criadouro	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	Criadouro	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	Criadouro	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	Criadouro	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	Criadouro	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
115	Criadouro	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
116	Criadouro	<i>Amazona vinacea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Amostras isoladas de swabs de aves assintomáticas

(continua)

Amostra	Origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
117	Criadouro	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
118	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	Criadouro	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
120	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
121	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
122	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
123	Ambulatório	<i>Psittacus erythacus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
124	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125	Criadouro	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	Criadouro	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
129	Criadouro	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
130	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
131	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
132	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
133	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
135	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
136	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Amostras isoladas de swabs de aves assintomáticas

(conclusão)

Amostra	Origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
143	Proj Arara az	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	Proj Arara az	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
146	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
147	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
148	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
149	Proj Arara az	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	Proj Arara az	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
151	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	Proj papag	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
153	Ambulatório	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
154	Ambulatório	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
155	Sorocaba	<i>Nandayus nenday</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156	Proj papag	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
157	Proj papag	<i>Nandayus nenday</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	Proj papag	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
159	Proj papag	<i>Nandayus nenday</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160	Proj papag	<i>Nandayus nenday</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 3 - Amostras isoladas de necropsias.

Amostra	Origem	Espécie	eae	bfp	EAF	Stx	EHly	ipa	sfa	pap	iss	LT	ST	iuc	tsh	HlyA	cnf
161	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
162	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
163	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
164	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
165	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	Ambulatório	<i>Ara ararauna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
168	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
169	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
170	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
171	Sorocaba	<i>Amazona amazonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
172	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
173	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
174	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 4 - Grupos filogenéticos detectados das amostras isoladas de necropsias:

Amostra	Origem	Espécie	Grupo			
			A	B1	B2	D
161	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	+	-	-	-
162	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	+	-	-	-
163	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	+	-	-	-
164	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	+	-	-	-
165	Sorocaba	<i>Ara ararauna</i>	+	-	-	-
166	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	+	-	-	-
167	Ambulatório	<i>Ara ararauna</i>	+	-	-	-
168	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	+	-	-	-
169	Sorocaba	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	+	-	-	-
170	Sorocaba	<i>Ara chloroptera</i>	-	-	-	+
171	Sorocaba	<i>Amazona amazonica</i>	+	-	-	-
172	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	+	-	-	-
173	Ambulatório	<i>Nymphicus hollandicus</i>	+	-	-	-
174	Ambulatório	<i>Amazona aestiva</i>	+	-	-	-

6 DISCUSSÃO

Os seguintes resultados foram obtidos.

6.1 EPEC

Neste estudo foram detectadas sete amostras positivas para o gene *eae* e que também foram positivas para o gene *bfp* caracterizando-as segundo Nataro e Kaper, (1998) como EPEC típicas.

EPEC típicas são raramente isoladas de animais, sendo que humanos são considerados os reservatórios naturais para esse patotipo (TRABULSI, 2002). Embora amostras *bfp* positivas tenham sido encontradas em cães e gatos (KRAUSE et al., 2005) e primatas não-humanos (CARVALHO et al., 2003).

Em relação a diversas espécies de aves existem relatos da detecção de EPEC, principalmente de isolados atípicos. Casos clínicos de EPEC atípicas afetando perdzizes foram descritos (diarréia severa e alta mortalidade) em fazendas no Reino Unido (LA RAGGIONE et al., 2004). Outro trabalho envolvendo galinhas também detectou EPEC atípicas em casos clínicos (KRAUSE et al., 2005). Outros isolados de EPEC foram relacionados à síndrome de enterite e mortalidade de peruzinhos caracterizada por prostração, diarréia e alta mortalidade (PAKPINYO et al., 2002). Verificou-se também a detecção em aves assintomáticas tais como pombos domésticos ferais (*Columba livia*) (PEDERSEN et al., 2006) e gaivotas (KOBAYASHI et al., 2002).

Todas as amostras desse estudo foram negativas para o plasmídeo EAF. Tal fato também foi relatado por Carvalho et al. (2003) com primatas. Como o gene *bfp* foi detectado nas amostras e este é codificado pelo plasmídeo EAF (NATARO; KAPER,

1998) talvez tenha ocorrido a perda deste plasmídeo durante os diversos subcultivos e estocagem das amostras.

Schremmer et al., (1999) em seu trabalho com 103 isolados de psitacídeos detectaram 7 amostras positivas para o gene *eae*, sendo que quatro foram caracterizadas como EPEC típicas. Todos os casos envolviam sinais clínicos de diarreia e enterite até septicemia. Os autores não conseguiram comprovar a origem das aves positivas, especulando que a maior parte teria nascido em cativeiro. Contudo, o que puderam afirmar é que nenhuma havia sido importada recentemente, fato que não exclui a possibilidade de terem um histórico de captura no meio selvagem e exportação para países desenvolvidos antes que essa forma de captura "legalizada" fosse totalmente banida pela União Européia em 2007.

Um fator em comum dentre as amostras no presente trabalho é o histórico de captura ilegal e venda no tráfico de animais silvestres. A presença de EPEC típicas em psitacídeos pode indicar a provável fonte de infecção, sendo a transmissão de caráter antroponótico a mais provável devido às péssimas condições sanitárias nas quais as aves capturadas no meio selvagem são submetidas. A única amostra de *E.coli* isolada do Projeto Papagaio-verdadeiro e classificada como EPEC era proveniente de um filhote que fazia parte de um experimento onde filhotes recém confiscados e clinicamente saudáveis eram introduzidos em ninhos no meio selvagem para serem criados por pais adotivos.

Esses achados são de grande valor como indicadores do provável histórico da ave, assim como em relação à necessidade de exames verificando o estado sanitário também para *E.coli* com potencial patogênico para aves a serem reintroduzidas na natureza.

Surtos envolvendo alta mortalidade em passeriformes por EPEC são descritos no Reino Unido e puderam ser relacionados a congregação de muitos indivíduos em comedouros para suplementar a alimentação durante o inverno. Os autores concluíram que a falta de alimento durante essa estação e o pequeno espaço disponível nos comedouros para um grande número de aves levava a agressividade territorial e subsequente estresse aumentando a susceptibilidade a doenças infecciosas a que

estariam expostos. Neste trabalho os autores não sugeriram a provável fonte de infecção para as aves, mas a presença do fator humano ao suplementar a alimentação pode indicar que originalmente a transmissão tenha ocorrido pelo contato indireto com o ser humano (FOSTER et al., 1998; PENNYCOTT et al., 1998).

A presença de EPEC em diversas espécies de psitacídeos aparentemente assintomáticos nesse trabalho demonstra uma possível interação estável na relação hospedeiro-parasita, levando a hipótese de que situações de estresse em cativeiro para aves portadoras assintomáticas desencadeariam o processo mórbido.

As implicações destes resultados demonstram serem de grande importância já que o trabalho anterior abordando esse tema (SCHREMMER et al., 1999) descreve a presença de EPEC apenas em aves com grave quadro clínico e em necropsias. O potencial zoonótico das amostras no presente estudo não poderia ser subestimado, já que os animais apresentando sintomas eram mantidos como aves de estimação. Também se observa a clara importância em relação a conservação e bem-estar destas aves, já que as aves assintomáticas estavam sendo mantidas em grupos onde a transmissão poderia ocorrer para outros indivíduos e pelo fato de duas amostras terem sido isoladas de espécies severamente ameaçadas de extinção, a Arara-de-Testa-Vermelha (*Ara rubrogenys*, amostra 64) e o Papagaio-Chauá (*Amazona rhodocorytha* amostra 68).

6.2 STEC

Apesar de não se encontrarem amostras positivas para o patótipo STEC, em outras espécies de aves relata-se a detecção como, por exemplo, em galinhas, onde 52 de 97 isolados clínicos (a maior parte em casos de síndrome da cabeça inchada), foi positiva para o genes *stx1* e *stx2* e negativa para os genes *eae* e *Ehly* (PARREIRA & GYLES, 2002).

Em pombos urbanos (*Columba livia domestica*) também foi detectada uma nova variante de STEC, caracterizada pela toxina Stx2 codificada pelo gene *stx2f* previamente não detectada com os *primers* disponíveis em literatura para as variantes conhecidas, levantando questões sobre quantas variantes ainda permanecem desconhecidas e sobre seu potencial zoonótico (SCHMIDT et al., 2000).

Outro trabalho envolvendo pombos ferais em fazendas de gado nos EUA não encontrou a presença de STEC nos *swabs* cloacais das aves capturadas. Pelo fato de que essas aves ficam frequentemente expostas aos principais reservatórios conhecidos de *E.coli* produtoras de toxinas Shiga, não se conseguiu concluir se houve falha no processamento das amostras ou se realmente pombos ferais não seriam fontes de infecção para STEC.

Schremmer et al., (1999) em seu trabalho com uma ampla gama de espécies de psitacídeos na Alemanha também não encontrou genes característicos de STEC. Pode-se supor que nas espécies de psitacídeos encontradas em ambientes onde há contato com gado e outros animais domésticos, tais como Araras-azuis no pantanal (GUEDES, 1993), haveria uma probabilidade maior de detecção de STEC. Entretanto, amostras de filhotes de *A.hyacinthinus* do Projeto Arara-Azul também foram negativas. Um número maior de amostragem poderia possivelmente esclarecer essa questão.

Apesar de que uma gama variada de animais selvagens possam eliminar *E.coli* do sorogrupo O157:H7 nas fezes (tais como verificado em cervídeos), a aparente prevalência parece ser menor do que em ruminantes. Uma explicação seria que o gado é criado intensivamente e o potencial para a exposição e aquisição do microrganismo é muito maior do que com animais de vida livre. Contudo, mesmo uma prevalência bastante pequena em animais selvagens migrando poderia levar a potencial exposição de muitos outros, como por exemplo aves aquáticas em locais de reprodução e eventualmente dispersar *E.coli* patogênicas (RICE, et al., 2003).

6.3 APEC

Numerosas amostras examinadas apresentaram positividade para um ou mais fatores de virulência comuns a APEC e UPEC (tabela 1 a 4).

Diversos fatores de virulência foram associados com casos clínicos de APEC, porém nenhum fator específico detectado contribuiu inteiramente para a patogenicidade em aves de produção (TIVENDALE et al., 2004). Estudos envolvendo aves selvagens são escassos (PEDERSEN et al., 2006) o que dificulta a interpretação dos achados tanto positivos quanto negativos em relação ao quadro clínico.

Em contrapartida, pesquisas envolvendo fatores de virulência de APEC em aves de produção são numerosas havendo, porém, divergência em relação a alguns resultados.

Num estudo envolvendo a detecção de fatores de virulência de *E.coli* em fezes de perus assintomáticos e em casos clínicos de colibacilose Altekruze et al. (2002), encontraram uma freqüência muito maior do gene *iss* em associação ao *tsh* nos casos clínicos do que em fezes, concluindo que essas cepas de APEC não constituem grande parte da microbiota entérica de perus.

A presença do gene *iss* por si só pode não ser suficiente para se identificar uma cepa de APEC, já que podem ser isoladas de aves assintomáticas. Tivendale et al. (2004) sugeriram que tanto os genes *iss* quanto o *iuc* são necessários para que ocorram níveis mais elevados de virulência em aves de produção.

Diversos estudos relatam a freqüência das cepas de APEC de possuírem e expressarem o sistema aerobactina-aquisição de ferro, enquanto que as cepas não patogênicas possuem o gene codificador da aerobactina com menos freqüência (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Dozois et al. (2000) demonstraram que gene *tsh* foi encontrado em maior freqüência nos casos de alta letalidade de colibacilose em galinhas, perus e patos, e autores como Janssen et al. (2001) reportaram uma maior freqüência do gene *tsh* em amostras de *E.coli* isoladas de órgãos, sugerindo que o gene *tsh* realmente seja um

marcador genético para cepas de APEC. Contrariando essa afirmação, McPeake et al. (2005) detectaram um grande número de amostras positivas para o gene *tsh* na microbiota entérica de galinhas assintomáticas.

Estudando os fatores de virulência em casos de colibacilose e em fezes de galinhas assintomáticas, Vanderkerchove et al. (2005) conseguiram determinar que alguns fatores tais como *iss*, *tsh* e *iuc* estavam presentes em maior frequência em isolados de casos clínicos do que em amostras fecais de aves assintomáticas. Contudo, nenhum dos fatores encontrados pode ser classificado como exclusivo dos casos clínicos. Os autores sugerem que juntamente com fatores ambientais, outros fatores de virulência ainda desconhecidos podem influenciar a ocorrência de surtos de colibacilose em aves de produção.

Amostras de psitacídeos sintomáticos e *tsh* positivas neste estudo foram sempre associadas ao gene *iss* (exemplo: amostras 55 e 65), ou ligada a outros genes (exemplo: amostras 14 e 21) havendo a possibilidade de se considerar uma participação no quadro clínico observado, embora *iss/tsh* também tenham sido detectados em uma amostra de ave assintomática (amostra 106).

O gene *iss* está relacionado à resistência sérica em casos de APEC (MELLATA et al., 2003) e o resultado no presente estudo de uma frequência constante de amostras positivas para este gene em aves com sintomatologia, parece indicar um papel deste fator de virulência com um maior potencial patogênico para psitacídeos. Isso parece ser bastante evidente em relação a amostra isolada de uma Calopsita (*N. hollandicus*) com grave quadro de diarreia e prostração (amostra 6), sendo positiva para *iss* em associação aos genes *sfa*, *pap*, *hlyA* e *cnf1*. Fato similar ocorre na amostra 52 (*A. aestiva*, positivo para *iss*, *sfa*, *pap* e *cnf1*) onde além da sintomatologia de grave prostração, houve o isolamento em cultura pura para *E. coli* de cloaca, observou-se 99% de bacilos Gram-negativos em esfregaço de fezes corado pelo Gram.

A associação entre os genes *iss* e *iuc* também foi encontrada em diversos casos clínicos (por exemplo: amostra 14, 29) podendo possivelmente relacionar-se a cepas de

maior potencial patogênico tal como verificou-se em aves de produção (TIVENDALE et al., 2004).

Contudo, nas amostras de psitacídeos assintomáticos também se observou uma frequência considerável de amostras positivas *iss*, mas nenhuma associada ao *iuc*.

Duas amostras foram positivas para os genes *sfa* e *cnf1* em associação ao *iss* (48 e 97), ambas provenientes de filhotes assintomáticos de *A.aestiva* de vida livre. Em galinhas a detecção do gene *sfa* foi relacionada a casos de onfalite, salpingite, septicemia, doença respiratória crônica complicada e síndrome da cabeça inchada (KNÖBL, 2005). Neste mesmo trabalho houve a detecção do gene *cnf1* em 14% das amostras de casos de APEC.

O achado destes genes em isolados de *E.coli* de aves sintomáticas (amostras 6 e 52) parece relacionar a fímbria S e a toxina CNF1 ao quadro clínico condizente com severa prostração indicativa de septicemia. Contudo, a detecção destes genes potencialmente patogênicos, em filhotes assintomáticos no ambiente selvagem e com pouco contato direto com humanos, parece reforçar a hipótese de que são os fatores ambientais presentes em cativeiro que desencadeariam a doença. A origem destas cepas talvez possa estar ligada a outras espécies animais, incluindo animais domésticos e o homem, uma vez que o habitat destas aves sofre considerável alteração devido a atividades humanas, especialmente pela agropecuária.

Casos clínicos de APEC em aves de produção relacionam a fímbria P à capacidade de aderir a órgãos internos (JANSSEN et al., 2001) e não houve casos positivos para esse gene dentre o grupo de aves assintomáticas. McPeake et al. (2005) encontraram uma frequência muito maior do gene *pap* em casos de septicemia do que em fezes de galinhas assintomáticas. O mesmo poderia possivelmente aplicar-se a psitacídeos.

A presença do gene *hlyA* foi detectada apenas nos casos com sintomatologia e associada a vários genes (amostras 6 e 14). Pelo fato de que amostras positivas para esse tipo de hemolisina serem encontradas em casos de UPEC principalmente em

humanos (REINGOLD et al., 1999), pode-se sugerir uma origem em comum para cepas isoladas destas aves mantidas como animais de estimação.

Não se encontraram fatores de virulência associados aos casos de necropsia, provavelmente devido ao pequeno número de casos em relação ao número de amostras de *swabs* de cloaca sintomáticos e assintomáticos.

6.4 EIEC

Não se obteve amostras positivas para EIEC, porém em aves de produção já se relatou a detecção de EIEC em casos de onfalite em pintinhos (ROSARIO et al., 2005).

6.5 ETEC

Nenhuma das amostras desse estudo foram classificadas como ETEC, embora ETEC já tenha sido associada esporadicamente a surtos de diarreia em aves de produção (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Assim como, no caso de STEC e EIEC, poderia possivelmente ser uma questão de testar-se um número maior de casos clínicos.

6.6 RISCOS PARA A REINTRODUÇÃO DE AVES NA NATUREZA E SOBRE A IMPORTÂNCIA DO ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Algumas amostras positivas para os fatores de virulência estudados (como exemplo, a amostra 68, 75 e amostra 79) foram coletadas de aves provenientes de um

criatório conservacionista cujo objetivo era o de realizar reforços populacionais em projetos de soltura de psitacídeos havendo, portanto a possibilidade de se introduzir microrganismos potencialmente patogênicos em populações selvagens.

Um estudo envolvendo aves marinhas em centros de reabilitação pesquisou os microrganismos que essas aves poderiam adquirir/transmitir quando em cativeiro e uma vez que fossem soltas, disseminar potenciais agentes infecciosos para as populações selvagens, assim como, pôr em risco o pessoal envolvido na reabilitação. Um total de seis amostras de *E.coli* de swabs cloacais de Gaivotas (*Larus* sp.) e Araus-comuns (*Uria aalge*) no centro de reabilitação foram positivos para o gene *eae* e uma das amostras examinadas foi positiva para um sorogrupo encontrado em suínos. Os autores concluíram que a susceptibilidade a determinado agente bacteriano pode ser influenciada por uma diversidade de fatores, incluindo o estresse psicológico e fisiológico envolvidos na reabilitação, medidas para minimizar o estresse durante o processo também devem ser enfatizadas (STEELE et al., 2005).

Outros casos de colibacilose demonstram como esse agente pode representar uma ameaça para programas de proteção de espécies ameaçadas como no caso do Íbis-de-Crista (*Nipponia nippon*) cuja única população ainda existente encontra-se em uma província isolada na China após a recente extinção (2003) da última população em território Japonês. Diversos casos de colisepticemia ocorreram em aves jovens mantidas em cativeiro tendo como possíveis fontes de infecção alimentos artificiais tais como: carne moída e pintinhos. Esses fatores levantam questões sobre os riscos de possíveis tentativas futuras de reforços populacionais tendo em vista patógenos que poderiam ser introduzidos em populações selvagens (XI et al., 2007).

Das quarenta amostras de filhotes psitacídeos de vida livre, todas foram positivas para o crescimento de enterobactérias e 25 para o isolamento de *E.coli*. O significado do grande número de amostras positivas em aves assintomáticas, em contrapartida com as mantidas em cativeiro sob condições sanitárias adequadas necessita ser melhor estudado já que contradiz resultados de pesquisadores de outros países (GRAY et al., 2007) contudo, poderia se pressupor que a microbiota de filhotes e adultos difere no meio selvagem, devido a condição de manutenção dos ninhos no meio natural onde há

acúmulo de fezes e matéria orgânica além da utilização prévia por outras espécies que possuem microbiota entérica diversa a de psitacídeos (rapinantes, anatídeos, ranfastídeos). Outra hipótese do porque psitacídeos em cativeiro seriam menos capazes de “suportar” microrganismos Gram-negativos no trato digestório seria mais relacionada ao estresse em condições cativas e a condição nutricional que as aves estão sujeitas, ao contrário do que ocorre com aves selvagens sem a interferência humana.

Um fator a se considerar é que as amostras processadas foram incubadas em caldo previamente à semeadura em placa, significando um resultado qualitativo e não quantitativo da presença de *E.coli*. O que significa que para as amostras de aves selvagens, a quantidade original de *E.coli* presente no trato entérico poderia ser insignificante em relação a outras bactérias na microbiota e, portanto um risco muito menor. No trabalho de Abilleira et al. (2006) utilizando a coloração de Gram obteve-se um baixo percentual (1,7%) de bacilos Gram-negativos em fezes de filhotes de vida-livre de Araras-azuis. Harrison e MacDonald (2003) também utilizando o método de Gram coletando amostras de diversas espécies de cacatuas selvagens na Austrália tiveram resultados similares, e de especial interesse a única amostra apresentando 30% de bacilos Gram-negativos no esfregaço foi justamente de uma ave que não aparentava estar clinicamente saudável.

Em cativeiro o contato diário com cepas de *E.coli* é muito mais freqüente e a carga bacteriana a qual o organismo das aves é desafiado diariamente é muito maior do que nas condições do meio selvagem. Somando-se a isso temos como fator de risco em cativeiro a presença de animais sinantrópicos como roedores, marsupiais, insetos, outras espécies de aves, animais domésticos (no caso de aves de estimação) e, portanto, a possibilidade de transmissão de cepas de *E.coli* para as quais o organismo de um psitacídeo pode não ser capaz de eliminar (condições nutricionais inadequadas, estresse psicológico e fisiológico) é muito maior. Conseqüentemente, a morbidade e a mortalidade são altas em situações onde o manejo em cativeiro é precário.

6.7 AMOSTRAS NEGATIVAS QUE NÃO EXPRESSARAM OS FATORES DE VIRULÊNCIA PESQUISADOS

Para as diversas amostras de aves sintomáticas que não apresentaram positividade para a PCR dos fatores de virulência pesquisados (por exemplo amostra 171), há a probabilidade da presença de fatores de virulência ainda não identificados e que as condições de cativeiro na qual as aves estão submetidas poderia se manifestar. Diferentes formas de estresse poderiam estar envolvidas o que possibilitaria que cepas de *E.coli* geralmente consideradas apatogênicas seriam capazes de produzir doença em aves, uma vez que o equilíbrio hospedeiro-parasita fosse alterado.

6.8 GRUPOS FILOGENÉTICOS

A análise em grupos filogenéticos para isolados de *E.coli* em aves de produção também têm resultados contraditórios. Campos (2006) classificou amostras através de grupos filogenéticos de 49 isolados de APEC e 30 amostras da microbiota sem sinais clínicos, seus resultados demonstraram que das amostras de galinhas assintomáticas 83% foram classificadas como pertencentes ao grupo A, 13% B1 e 3% no grupo B2 e nenhuma no grupo D.

Johnson et al. (2003), reportaram que isolados de cloaca de aves de produção, e de *E.coli* patogênicas, foram mais freqüentemente classificados como derivados dos grupos filogenéticos B2 e D e apresentaram mais genes associados à virulência do que os classificados como comensais.

Em outro trabalho, casos de colibacilose aviária foram identificadas (50%) como pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 e o restante (50%) classificados como pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). Esses

autores concluíram que a classificação de metade das amostras em um grupo considerado não patogênico seria explicado pela natureza oportunista de infecções de *E.coli*.

No presente trabalho a maior parte das amostras isoladas de necropsias apresentaram positividade para o grupo A e somente uma amostra para o grupo D (amostra 170 em associação ao gene *iss*). Pelo fato de que grande parte dessas amostras que teoricamente seriam classificadas em grupos mais patogênicos foram agrupadas no grupo A, parece também indicar cepas de caráter oportunista como citado por Rodriguez-Siek et al. (2005) ou existiria a possibilidade de que a metodologia proposta para o agrupamento filogenético não seja a mais adequada para se classificar amostras de *E.coli* de origem aviária.

6.9 ESTRESSE

Existem muitos fatores que influenciam o tipo e a intensidade de respostas imunes a patógenos. Entre esses incluem-se fatores intrínsecos como idade e sexo, assim como fatores extrínsecos tais como condições ambientais, interações sociais, exposição a agentes tóxicos e a qualidade da dieta (KOUTSUS; KLASING, 2008).

Muitas doenças em aves, assim como em outras espécies, se iniciam com um sistema imunológico deprimido podendo ser causado por condições físicas ou psicológicas. As fontes psicológicas podem ser o estresse ambiental, falta de sociabilização, frustração sexual, maus-tratos ou negligência. O curso da doença quando exposto a um agente infeccioso será dependente da estabilidade do sistema imune (NESS, 2006).

O papel do estresse psicológico na capacidade de combater infecções bacterianas, virais e parasitárias foi estudado como um co-fator potencial de doenças

infecciosas. O estresse psicológico parece ser capaz de alterar a susceptibilidade de animais a agentes infecciosos, influenciando o aparecimento, curso e resolução de certas doenças. Este assunto é estudado pela psiconeuroimunologia que aborda as complexas relações entre os fatores psico-sociais, o sistema nervoso central, o sistema imune e os agentes infecciosos (BIONDI; ZANNINO, 1997).

As formas de estresse tendem a ser cumulativas, e uma única ocorrência de situação de estresse freqüentemente tem pouco efeito clínico sobre a ave hígida. No entanto, quando uma ou mais situações estressantes ocorrem, a ave pode já estar enfraquecida a ponto de ficar clinicamente doente ou vir a óbito (NESS, 2006).

Comparando-se com o que ocorre em aves de produção, a maior parte das ocorrências de doenças causadas por *E. coli* são secundárias a fatores predisponentes ambientais e do hospedeiro. Portanto, as perdas com aves domésticas podem ser consideravelmente diminuídas ao se controlar esses fatores primários (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Define-se por imunossupressão como "Um estado temporário ou permanente de disfunção da resposta imune resultante de agressões ao sistema imune e levando a uma susceptibilidade maior à doença" (CHAT; SKINNER, 2008).

A maioria dos fatores ambientais causando imunossupressão em aves estão relacionados a problemas de manejo tais como suprimento inadequado de água e comida, estresse térmico, interações sociais e presença de micotoxinas no alimento que levam a um aumento na produção de corticosterona (CHAT; SKINNER, 2008).

O estresse social e ambiental afeta o sistema imunológico e aumenta à susceptibilidade a doenças. Verificou-se que em aves de produção (tais como galinhas poedeiras) cuja genética e manejo são muito bem estabelecidos, ao se proporcionar acesso a poleiros e outros comportamentos naturais conseguiu-se diminuir os efeitos deletérios do estresse ambiental (KOUTSUS; KLASING, 2008).

Matson et al. (2006) estudaram os efeitos do estresse no sistema imunológico ao testar a capacidade bactericida *in vitro* de *E. coli* adicionada ao plasma sanguíneo e medir os efeitos da imunidade inata em cinco espécies de passeriformes tropicais. Os autores coletaram o sangue das aves no momento da captura (rede de neblina) e após 60 minutos, mantendo-se as aves dentro de sacos em ambiente com ar condicionado. Em três das cinco (05) espécies o estresse causou efeitos negativos consideráveis na capacidade bactericida.

Outro fator importante a se considerar em relação a aves selvagens é o estado nutricional. A nutrição é uma conexão crítica entre as práticas de manejo e a saúde de um psitacídeo (NESS, 2006).

Sem técnicas de manejo adequadas, uma ave hígida e com boa genética não irá manter-se saudável, e uma dieta balanceada e um programa de sanidade administrado de maneira profissional deve ser proporcionado para se assegurar a saúde a longo prazo de uma ave selvagem em cativeiro (NESS, 2006).

O desenvolvimento, manutenção e resposta do sistema imune dependem de uma nutrição balanceada, não restando dúvidas que deficiências nutricionais severas afetam o sistema imunológico e aumentam a susceptibilidade a agentes infecciosos (KOUTSUS; KLASING, 2008). Além disso, a alimentação a base de sementes (principalmente a semente de girassol, milho e amendoim) não só é uma das causas mais comuns para deficiências nutricionais em psitacídeos, mas também é uma fonte comum de micotoxinas (BRUE, 1994). Os efeitos das micotoxinas não são amplamente considerados em estudos envolvendo aves em cativeiro. A ingestão deste tipo de toxinas pode resultar em doença e freqüentemente em imunossupressão. As micotoxinas podem suprimir as respostas do sistema imune devido à hepatotoxicidade, atrofia dos órgãos linfóides durante o desenvolvimento e supressão de imunidade celular. As micotoxinas também exercem efeitos diretos sobre o sistema imune no trato gastrointestinal ao reduzir a integridade epitelial (KOUTSUS; KLASING, 2008).

As micotoxinas podem atuar de diferentes maneiras no organismo conforme a concentração ingerida, podendo ocorrer mortalidade em dois a três dias com doses

tóxicas até a exposição crônica de níveis moderados de toxina, onde ocorre menor resistência a doenças juntamente com lesões no fígado, rins, sistema nervoso, sistema reprodutor e tegumento. O tipo do efeito e da resposta é relacionado ao nível de exposição e duração (BRUE, 1994). Muitas micotoxinas, particularmente a aflatoxina, os tricotecenos (toxina T2) e ocratoxina têm efeitos metabólicos no organismo que diminuem os mecanismos de defesa do sistema imune, como a inibição da síntese protéica e redução de alfa e beta globulinas que foi encontrada após à exposição de aflatoxinas (BRUE, 1994). Os efeitos da exposição de micotoxinas podem variar segundo o tipo de toxina e espécie, mas também devido ao estado nutricional e estado fisiológico do paciente. Uma ave estressada e/ou uma que tenha uma dieta inadequada é mais susceptível a se intoxicar por uma dose menor de micotoxinas do que uma ave saudável e com uma dieta balanceada (BRUE, 2006).

No entanto, é realmente difícil estabelecer um diagnóstico de micotoxicose em aves pelo fato de que as alterações clínicas e histopatológicas frequentemente mimetizam outras doenças ou podem ser consequência a infecções secundárias (BRUE, 2006).

Apesar de haver uma enorme necessidade de estudos nesse assunto, a mensuração de mudanças na imunocompetência devido a fatores ambientais tais como: as diversas formas de estresse, nutrição, agentes tóxicos ou eventos da história natural (muda de penas, migração, reprodução) requerem uma análise sistemática com resultados que possam refletir a realidade, algo que não é facilmente detectado (KOUTSUS; KLASING, 2008).

Outra dificuldade em avaliar o que seria uma condição fisiológica normal tendo como foco as aves no estado selvagem são as limitações devido às dificuldades de se capturar e recapturar os mesmos indivíduos, artefatos devido ao estresse da captura, parâmetros laboratoriais adequadas às diferentes espécies de aves e a estrutura anatômica-corporal de muitas espécies (KOUTSUS; KLASING, 2008).

As condições ambientais que favorecem a colonização e multiplicação no organismo parecem ser fatores muito mais determinantes para o estabelecimento da colibacilose em psitacídeos.

Em suma, analisando os resultados pode-se considerar que a presença de *E. coli* (havendo ou não a detecção de fatores de virulência cuja patogenicidade possa ser correlacionada) em psitacídeos mantidos em cativeiro, como normal sem que haja sintomatologia, equivale a aceitar que potenciais riscos para a saúde da ave estarão sempre presentes apenas esperando o momento propício para se manifestar. Este fato não é aceitável em termos de bem-estar animal e manutenção em cativeiro de espécies severamente ameaçadas de extinção.

Ainda que consideremos a colibacilose como causa de problemas entéricos e sistêmicos em psitacídeos, sendo oportunista e secundária a uma série de fatores, isso não diminui seu papel e importância como patógeno participando do processo mórbido, e retirar-se esse fator de risco da cadeia epidemiológica sem dúvida auxiliaria na manutenção destas aves em cativeiro.

7 CONCLUSÕES

- Das amostras analisadas sete foram classificadas como EPEC, noventa tiveram fatores de virulência comuns a APEC/UPEC, e nenhuma para STEC, EIEC, e ETEC.
- Dos fatores de virulência analisados independente da sintomatologia clínica foram detectados nos isolados a presença dos fatores *eae*, *bfp*, *sfa*, *pap*, *iss*, *iuc*, *tsh*, *HlyA*, *cnf*.
- Ocorreu uma maior freqüência de detecção do gene *iss* sendo este encontrado em 30 amostras de aves sintomáticas (51.7%) e em 23 amostras de aves assintomáticas (23.2%).
- Das amostras testadas 13 foram positivas para o grupo A e uma para o grupo D.
- A presença de fatores de virulência parece estar relacionada com uma maior patogenicidade em aves sintomáticas (diarréia, prostração, necropsias).
- Analisando a origem das amostras estudadas foi possível se fazer uma associação com a detecção de genes que caracterizam o patotipo EPEC, e este poderia ser considerado um biomarcador do histórico da ave, ou seja, de aves provenientes de tráfico.

8 REFERÊNCIAS

- ABILLEIRA, F. S.; CORBELLINI, A. O.; ALLGAYER, M. C.; GUEDES, N. M. R.; WEIMER, T. A.; OLIVEIRA, S. J. Verificação da microbiota fecal em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre no pantanal através da técnica de coloração de gram. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 30., 2006, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SZB, 2006, p.43.
- ALTEKRUSE, S. F.; ELVINGER, F.; DEBROY, C.; PIERSON, F. W.; EIFERT, J. D.; SRIRANGANATHAN, N. Pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains from turkeys in a commercial operation. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 562-569, 2002.
- ARANDA, K.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.
- BANGERT, R. L.; CHO, B. R.; WIDDERS, P. R.; STAUBER, E. H.; WARD, C. S. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n. 1, p. 46-52, 1988.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD; SWAYNE, L. R. D. E. **Diseases of Poultry**. Ames, EUA: Iowa State University, 2004. p. 631-656.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n.9, p. 2483-2488, 1993.
- BIONDI, M.; ZANNINO, L., G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. **Psychotherapy Psychosomatics**, v. 66, n. 1, p. 3-26, 1997.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; GONZALEZ, E.; BERNARDEZ, M. I. Epidemiology of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) in

ruminants. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; MCDOWELL, D. A. **Verocytotoxinogenic *E. coli***. Connecticut, EUA: Food and Nutrition Press, 2001. p. 113-278.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BLANCO, G. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2958-2963, 1997.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, L. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRUE, R. N. Nutrition. In: RITCHIE, W. B.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth, EUA: Wingers, 1994. p. 63-95.

CAMPOS, T. A. **Caracterização clonal e biológica de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária**. 2006. 200 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética e Evolução, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATAO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1225-1234, 2003.

CHAVES, E. M.; WERNECK, M. R.; GÓRSKY, A.; LAMAZÁRES-PERÉZ, M. D. C.; CHANG, M. R.; GUEDES, N. M. R.; ARAÚJO, F. R. Microbiota de orofaringe e cloaca de filhotes de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*): Resultados preliminares. In: ENCONTRO DE BIÓLOGOS DO CRB-1 (SP, MT, MS), 11, 2000, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro: ECB, 2000, p. 85.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.
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.

DHO, M.; LAFONT, J. P. *Escherichia coli* colonization of trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. **Avian Diseases**, v. 26, n. 4, p. 787-797, 1982.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, n. 2, p. 299-316, 1999.

DORRESTEIN, G. M.; BUITELAAR, M. N.; VAN DER HAGE, M. H., ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 951-962, 1985.

DOZOIS, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BREE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the *tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-4154, 2000.

DUGUID, J. P.; OLD, D. C. A introduction: historical perspective. In: KLEMM, P. **Fimbriae adhesion, genetics, biogenesis and vaccines**. Boca Raton, EUA: CRC, 1994. p. 1-7.

DUTTA, S.; CHATTERJEE, A.; DUTTA, P.; RAJENDRAN, K.; ROY, S.; PRAMANIK, K. C.; BHATTACHARYA, S. K. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhea in Calcutta, India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 667-674, 2001.

EWERS, C.; JANSEN T.; KIESLING, S.; PHILIPP, H-C.; WIELER, L. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 49, n. 2, p. 269-273, 2005.

EWING, W. H. The genus *Escherichia*. In: EWING, W. H. **Edward and Ewing's identification of enterobacteriaceae**. New York, EUA: Elsevier, 1986. p. 93-134.

FALCÃO, D. P. **Enteropatógenos e outros microrganismos gram-negativos patogênicos**. Apostila do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara: UNESP, 2000. 30 p.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 30-41.

FIENNES, R. N. Diseases of bacterial origin. In: PETRAK, M. L. **Diseases of cage and aviary birds**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p. 497-514.

FLAMMER, K.; DREWES, L. A. Species related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n.1, p. 79-83, 1988.

FOSTER, G.; ROSS, H. M.; PENNYCOTT, T. W.; HOPKINS, G. F.; MCLAREN, I. M. Isolation of *Escherichia coli* O86:K61 producing cyto-lethal distending toxin from wild birds of the finch family. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 395-398, 1998.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.10, p. 2460-2463, 1994.

BRASÍLIA. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. IBAMA. GEO Brasil 2002: **Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2002.

GODOY, S. N. **Patologia comparada de psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo**. 2001, 214 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

GOMES, M. S. **Implantação de medidas profiláticas no Zoológico do Município de São Bernardo do Campo**: uma análise de custo - benefício. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

GRAY, P. L.; XENOULIS, P. G.; BRIGHTSMITH, D.; TIZARD, I.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the fecal bacterial flora of healthy wild and captive parrots. In: ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 28, 2007, Rhode Island, EUA. **Proceedings...** Rhode Island: AAV, 2007, p. 271-273.

GREENWOOD, A. G. The echo responds - a partnership between conservation biology, aviculture and veterinary science. In: INTERNATIONAL AVICULTURISTS SOCIETY, 1996, Orlando, FL. **Proceedings...** 1996. Disponível em: <<http://www.funnyfarmexotics.com/IAS/Echo.htm>>. Acesso em 28 out. 2008.

GUEDES, N. M. R. **Biologia reprodutiva da Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal - MS, Brasil**. 1993, 122 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1993.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLENDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity island of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 1, p.1089-1097, 1997.

HARRISON, G. J.; MACDONALD, D. Preliminary field study of fecal gram's stain results in two free-ranging Australian parrot species. **Exotic DVM**, v. 4, n. 6, p. 10-11, 2003.

HORNE, S. M.; PFAFF-MCDONOUGH, S. J.; GIDDINGS, C. W.; NOLAN, L. K. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 179-184, 2000.

JANSSEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H-C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPESM, M.; SMITH, K. E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161-2168, 2003.

KNÖBL, T. **Caracterização epidemiológica, molecular e de virulência de *Escherichia coli* sfa+ isoladas de aves**. 2005. 100 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

KOBAYASHI, H.; POHJANVIRTA, T.; PELKONEN, S. prevalence and characteristics of intimin- and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 11, p. 1071-1073, 2002.

KOUTSUS, E.; KLASING, K. C. Factors modulating the avian immune system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. Londres, Reino Unido: Academic Press, 2008. p. 323-338.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 87-95, 2005.

LA RAGGIONE, R. M.; COOLEY, W. A.; PARMAR, D. G.; AINSWORTH, H. L. Attaching and effacing *Escherichia coli* O103:K+:H- in red legged partridges. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 13, p. 397-398, 2004.

MATSON, K. D.; TIELEMAN, B. I.; KLASING, K. C. Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 3, p. 556-564, 2006.

MATTES, B. R.; CONSIGLIO, S. A. S.; ALMEIDA, B. Z. de; GUIDO, M. C.; ORSI, R. B.; SILVA, R. M. da ; COSTA, A.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 13-16, 2005.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, n.1, 106-118, 1998.

MCPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 3-4, p. 245-253, 2005.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS, R.; BROWN, P. K.; ARNE, P.; BREE, A.; DESAUTLES, C.; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n.1, p. 536-540, 2003.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 269-277, 2004.

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

NESS, R. D. Integrative therapies. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. Florida, EUA: Spix, 2006. p. 343-364.

PAKPINYO, S.; LEY, D. H.; BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GUY, J. S. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p. 360-369, 2002.

PANIGRAPHY, B.; HARMON, B. G. Bacterial septicemias in two psittacine birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 9, p. 983-984, 1985.

PARREIRA, V. K.; GYLES, C. L. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 341-352, 2002.

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

PENNYCOTT, T. W.; ROSS, H. M.; MCLAREN, I. M.; PARK, A.; HOPKINS, G. F.; FOSTER, G. Causes of death of wild birds of the family *Fringillidae* in Britain. **Veterinary Record**, v. 143, n. 6, p. 155-158, 1998.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *Escherichia coli hlyA*, *rfb* O11, and *rfb* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998.

PENTEADO, A. S.; UGRINOVICH, L. A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; ANDRADE, J. C. R.; CORRÊA, S. S.; PESTANA DE CASTRO, A. F.

Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 41-51, 2002.

REINGOLD, J.; STARR, N.; MAURER, J.; LEE, M. D. Identification of a new *Escherichia coli* she haemolysin homolog in avian *E.coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 2, p.125-34, 1999.

RICE, D. H.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Faecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Record**, v. 152, n. 3, p. 82-83, 2003.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M.; TOKHI, A. M.; ADAMS, L. M.; BENNETT-WOOD, V.; MOISIDIS, A. V.; KREJANY, E. O.; O'GORMAN, L. E. Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1584-1592, 1994.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241-256, 2005.

ROSARIO, C. C.; PUENTE, J. L.; VERDUGO-RODRIGUEZ, A.; ANDERSON, R. C.; ESLAVA, C. C. Phenotypic characterization of *ipaH* *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection. **Avian Diseases**, v. 49, n. 3, p. 409-417, 2005.

SAIDENBERG, A. B. S.; KNÖBL, T. Colibacilose em aves silvestres: revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 8, n. 1-3, p. 16-28, 2005.

SCHAT, K.; SKINNER, M. A. Avian immunosuppressive diseases and immune evasion. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian immunology**. Londres, Reino Unido: Academic Press, 2008. p. 299-322.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L. H.; KARCH, H. A New shiga-toxin 2 variant (*st2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1205-1208, 2000.

SCHREMMER, C.; LOHR, J. E.; WASTLHUBER, U.; KÖSTERS, J.; RAVELSHOFER, K.; STEINRÜCK, H.; WIELER, L. H. Enteropathogenic *Escherichia coli* in *Psittaciformes*. **Avian Pathology**, v. 28, n. 1, p. 349-354, 1999.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; VAN KETEL, R.; WEVEK, D.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non-radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 2393-2397, 1994.

SICK, H. Composição da avifauna brasileira. In: SICK, H. **Ornitologia brasileira**. São Paulo: Nova Fronteira, 1997. p.124.

SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. In: SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. **Parrots - status survey and conservation action plan 2000–2004**. Gland, Suíça; Cambridge, Reino Unido: IUCN; The World Parrot Trust, 2000. p. 98-151.

STEELE, C. M.; BROWN, R. N.; BOTZLER, R. G. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the pacific coast of California and Washington, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 735-744, 2005.

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

TIVENDALE, K. A.; ALLEN, J. L.; GINNS, C. A.; CRABB, B. S.; BROWNING, G. F. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6554-6560, 2004.

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

TREVENA, W. B.; HOOPER, R. S.; WRAY, C.; WILLSWAW, G. A.; CHEASTY, T.; DOMINGUE, G. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. **Veterinary Record**, v. 138, n. 16, p. 400, 1996.

VANDERKERCHOVE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSEN, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J. P.; BAETS, L. D.; BUTAYE, P.; VAN IMMERSEEL, F.; WATTIAU,

P.; LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B.; PASMANS, F. Virulence associated traits in avian *Escherichia coli*, comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1-2, p. 75-87, 2005.

WELLS, J. G.; SHIPMAN, L. D.; GREENE, K. D. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga-like-toxin producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 985-989, 1991.

WIELER, L. H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2980-2984, 1996.

XI, Y.; WOOD, C.; LU, B.; ZHANG, Y. Prevalence of a septicemia disease in the crested ibis (*Nipponia nippon*) in China. **Avian Diseases**, v. 51, n. 2, p. 614-617, 2007.

YAMAMOTO S.; TERAJ A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85-90, 1995.