

ANDRÉ BECKER SIMÕES SAIDENBERG

**Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional**

São Paulo

2013

ANDRÉ BECKER SIMÕES SAIDENBERG

**Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional**

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva

**Área de concentração:**

Epidemiologia Veterinária

**Orientador:**

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

São Paulo  
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2832  
FMVZ

Saidenberg, André Becker Simões

Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* – Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional / André Becker Simões Saidenberg. -- 2013.

93f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. *Amazona vinacea*. 2. Aves silvestres. 3. Bactéria. 4. Psitacídeo. 5. Exames sanitários. 6. Papagaio-de-peito-roxo. 7. Reintrodução. 8. Vírus. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de protocolos sanitários para psitacídeos em cativeiro e análise de programas de relocação populacional", protocolado sob o nº 2189/2011, utilizando número indeterminado de papagaios, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Health assessment protocols of parrots in captivity and analysis of relocation programs", protocol number 2189/2011, utilizing undetermined number of parrots, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day.05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Saidenberg, André Becker Simões

**Título: Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional**

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

"We cannot glimpse the essential life of a caged  
animal, only the shadow of its former beauty."

(Julia Allen Field)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar aos animais sem os quais não é possível a execução de nenhum trabalho desse gênero em nosso meio. Agradeço às aves que fizeram parte desse projeto e lamento por tantas outras que não puderam ser auxiliadas. A tentativa é a de restituir a elas o que é por direito e contribuir para nossa própria sobrevivência como espécie a longo prazo.

Muitíssimo obrigado ao Prof. Nilson e Priscilla A. Melville pelo apoio e ajuda não apenas profissional, mas também pela amizade pessoal em inúmeras vezes durante esses anos que passaram tão rapidamente.

À FAPESP pela bolsa de estudos sem a qual não seria possível a continuidade deste estudo.

À Fundação Lymington na figura do Sr. William e Dona Linda Wittkoff pelo seu apoio contínuo, incansável trabalho diário, entusiasmo e amor pelas aves que não são observados em outras pessoas que tenham 1/3 de seu histórico de vida. O Sr. Bill e Dona Linda infelizmente são a exceção em nosso país que sequer é sua pátria original. Agradecimentos também ao Sr. Carlos Oliveira por se empenhar 110% e além por estas aves.

Um enorme agradecimento à Superintendência do IBAMA em SP, em especial a Carlos Yamashita, Vincent Kurt Lo, Jury P. M. Seino, e Geraldo Motta pelo apoio, conselhos, e retidão em executar o objetivo do órgão fazendo frente às políticas daqueles que cruzam os braços e criam impedimentos para a preservação de nossa fauna.

À Secretaria do Meio Ambiente no Estado de São Paulo especialmente na pessoa de Daniela Desgualdo P. Osorio Bueno.

Ao World Parrot Trust por criar a ideia, patrocinar e acreditar que seria possível apesar de tantos fatores e pessoas contrárias a isso.

Ao suporte da ONG R3 Animal, Universidade Federal de Santa Catarina (LETA-UFSC), CEMAVE/ICMBio, e Polícia Ambiental de Santa Catarina.

Agradecimentos ao Prof. Paulo E. Brandão, Prof. Fábio Gregori, Profa. Terezinha Knöbl, e Enio Mori pelo apoio, solução de dúvidas e troca de ideias em inumeráveis momentos.

Às colegas de laboratório Eveline, Sandra, e Fernanda pelo grande auxílio e convivência.



## RESUMO

SAIDENBERG, A. B. S. **Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional** [Health survey protocols for the Vinaceous Amazon (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) in captivity and analysis of relocation projects]. 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Um componente da conservação de animais selvagens é a relocação de espécies comumente referida como projetos de soltura. Para que esta seja bem sucedida os candidatos do projeto devem estar livres de patógenos considerados de importância para a espécie. Segundo a Instrução Normativa 179 oficializada pelo IBAMA em 25/06/2008, determinou-se a realização de exames laboratoriais como medidas a se prevenir a introdução de agentes infecciosos no ambiente, e garantir a sobrevivência a longo prazo dos animais em questão. No Brasil encontra-se a maior quantidade em espécies de psitacídeos, e das 84 espécies, 13 são vulneráveis a criticamente ameaçadas de extinção. Diversos projetos de relocação de animais silvestres, incluindo vários já bem sucedidos com psitacídeos, vêm sendo realizados em território nacional além dos existentes do exterior. O Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) tem suas populações severamente afetadas, sendo classificada no estado de São Paulo como criticamente ameaçada e como ameaçada a nível mundial. Apesar das dificuldades para a conservação dos recursos naturais, existem remanescentes de habitat protegido e em regeneração que podem abrigar espécies que historicamente ocupavam estes locais, de maneira que projetos de reintrodução visando *A. vinacea* como espécie bandeira em São Paulo e em Santa Catarina, foram contatados para realizar a pesquisa sanitária prévia à soltura. Foram realizados suabes cloacais em amostragens seriadas de modo a identificar possíveis portadores para os agentes paramixovírus tipo 1, influenza tipo A, poxvírus aviário, coronavírus, *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), e *Salmonella* spp., em indivíduos da espécie confiscados do tráfico, através da reação em cadeia pela

Polimerase (PCR), objetivando sequenciar os possíveis resultados positivos, discutindo a viabilidade e custos segundo as determinações da IN 179/2008. Amostras após a liberação também foram coletadas na forma de fezes obtidas no recinto de aclimatação e/ou ao redor dos comedouros de alimentação suplementar. Obtiveram-se um total de 151 amostras somadas em todas as coletas seriadas, sendo 103 amostras de suabes cloacais de aves ainda em cativeiro e 48 amostras de fezes não individualmente caracterizadas das aves soltas. Das amostras testadas para os agentes com potencial infeccioso obtiveram-se apenas resultados positivos para *E.coli*, totalizando 36 isolados, embora nenhum tenha sido caracterizado como EPEC. Observou-se uma tendência para maior detecção de *E.coli* nas amostragens iniciais em comparação com as finais, fato ligado principalmente às melhorias no manejo empregadas. A possibilidade de se comparar resultados em amostragens seriadas foi importante para uma avaliação mais segura quanto à sanidade dos animais envolvidos, auxiliando a determinar a seleção das aves, não havendo relatos de doenças imediatamente após a soltura ou no monitoramento a longo prazo. A baixa frequência de amostras positivas para os agentes que poderiam inviabilizar a liberação parece demonstrar que existe um exagero de que doenças representam um risco extremo impedindo projetos de relocação. Procedimentos de quarentena adequados e a realização de um mínimo de exames reduzem os riscos envolvidos, fato observado no presente estudo tanto em cativeiro como no processo de liberação e posteriormente. Para as instituições amostradas havia um limitado recurso anual que não seria capaz de pagar por exames individuais. Uma opção é a de testar amostras em *pool* para diminuir os custos, e caso haja positivos, procurar retestar para identificar os indivíduos. A baixa prevalência de positividade para os agentes com potencial infeccioso neste estudo, demonstra que amostras em *pool* podem ser uma alternativa econômica, caso o exame individual esteja fora de questão. Tendo em vista que para obter um mínimo de segurança no projeto de relocação no Brasil depende-se quase exclusivamente da iniciativa privada, convênios com universidades tornam-se não apenas uma necessidade, mas

também uma oportunidade para troca em direção a um objetivo em comum e geração de conhecimento científico.

Palavras-chave: *Amazona vinacea*, aves silvestres, bactéria, exames sanitários, Papagaio-de-peito-roxo, psitacídeo, reintrodução, vírus.

## ABSTRACT

SAIDENBERG, A. B. S. **Health survey protocols for the Vinaceous Amazon (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) in captivity and analysis of relocation projects** [Avaliação de protocolos sanitários para a espécie Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) em cativeiro e análise de programas de relocação populacional] 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

One component in the conservation of wild animals is the relocation of species, commonly referred as release projects. In order for this attempt to be successful the candidates must be clear of pathogens of significance for the species. According to the normative rule 179 established by the IBAMA in 25/06/2008, it was determined that a series of laboratorial exams should be performed in order to prevent the introduction of infectious agents in the environment and guarantee the long term survival of the animals. The largest number of psittacine species is found in Brazil accounting for 84 species, with 13 of these classified as vulnerable to critically endangered. Several relocation projects with wild animals, including several well succeeded with psittacines have been taking place on a national scale besides others being carried out around the world. The Vinaceous Amazon (*Amazona vinacea*) have had its populations severely affected being classified as critically endangered in the state of São Paulo and globally threatened. Although there are challenges to conserve natural resources, available remnants of protected and regenerating habitat can be found and could support species that historically inhabited these sites, hence reintroduction projects with *A.vinacea* as a flagship species in the state of São Paulo and Santa Catarina were contacted to perform a health survey previously to the releases. Cloacal swabs were taken in paired samplings in order to detect possible carriers for paramyxovirus typ1, influenza type A, avian poxvirus, coronavirus, Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), and *Salmonella* spp.; in individuals that were confiscated from the illegal trade employing the Polymerase Chain Reaction (PCR), aiming to sequence possible positive results and discussing the viability and costs according to the determination of the

IN/179/2008. Fecal samples were also collected after the release in the acclimation flight and/or surrounding the supplemental feeders in the area while still adapting in the post-release. A total of 151 samples were obtained altogether with 103 of these being cloacal swabs of the birds still in captivity and 48 fecal samples non individually characterized of released birds. Out of the tested samples only *E.coli* yielded positive results with a total of 36 isolates, although none was characterized as EPEC. A tendency was observed for a higher detection of *E.coli* in the initial samplings compared to the final ones, a fact mainly connected husbandry improvements that were put in use. The possibility to compare results in paired samplings was important in order to obtain a safer evaluation concerning the health status of the animals, helping to determine the bird's selection and no health problems reported neither immediately after the release nor on the long term monitoring. The low frequency of positive samples for the agents that could jeopardize a release seems to show that there is an exaggeration that diseases represent an extreme risk to the point of hampering relocation projects. Adequate quarantine procedures and performing minimum health examinations minimize the involved risks, a fact observed in this study both in captivity as well as in the release and post release process. For the studied institutions there was a limited annual budget that would not be capable to pay for individual exams. One option is to test pooled samples to lower associated costs, and if a positive is found, retest to identify the individuals. The low prevalence for the tested agents in this study show that pooled samples could be a viable alternative when individual exams are not feasible. Taking into account that to obtain a minimum in terms of safety for a relocation project in Brazil one is almost exclusively dependent on private parties, cooperation with universities are not only a necessity but also an opportunity for exchanges toward a common goal besides generating scientific knowledge.

Keywords: *Amazona vinacea*, bacteria, health surveys, psittacine, reintroduction, vinaceous amazon, virus, wild birds.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de amostras positivas e porcentagem para <i>Escherichia coli</i> .....	50
----------	---	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Sequencias e fragmentos esperados dos <i>primers</i> utilizados.....	86
Quadro 2	Resultados positivos para <i>Escherichia coli</i> dentre amostragens.....	87
Quadro 3	Resultados positivos para <i>Escherichia coli</i> na ONG R3 Animal.....	89
Quadro 4	Resultados positivos para <i>Escherichia coli</i> na Fundação Lymington..	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp	pares de bases
CETAS	Centro de triagem de animais silvestres
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	gravidade terrestre
M	molar
µg	micrograma
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
µM	micromolar
ONG	Organização não-governamental
PBS	solução salina tamponada
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
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

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 Coleta das amostras.....	33
4.2 Métodos pós soltura.....	33
4.3 Coletas no criatório conservacionista.....	34
4.4 Coletas na ONG R3 Animal.....	35
4.5 Coletas na Fundação Lymington.....	36
4.6 Controles positivos.....	38
<b>5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS</b> .....	39
5.1 Cultura bacteriana e identificação bioquímica.....	39
5.2 Extração do DNA bacteriano e viral e RNA viral.....	39
5.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de EPEC, e para <i>Salmonella</i> spp.....	40
5.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para vírus DNA.....	41
5.5 Reação em cadeia pela polimerase através da transcriptase reversa (RT-PCR) para vírus RNA.....	41
5.6 Detecção do amplicon.....	42
5.7 Sequenciamento de DNA.....	42
5.8 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA.....	42
5.9 Edição de sequencias.....	43
5.10 Análise filogenética.....	44
<b>6 RESULTADOS</b> .....	45
6.1 ONG R3 Animal.....	45
6.2 Fundação Lymington.....	46
6.3 Amostras de EPEC sequenciadas.....	47
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	51

7.1 Discussão sobre os agentes pesquisados.....	51
7.2 Discussão dos riscos de relocações.....	63
7.3 Discussão dos custos envolvidos.....	68
7.4 Consequências do projeto.....	71
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>10 APÊNDICE A.....</b>	<b>86</b>
10.1 Quadro 1.....	86
10.2 Quadro 2.....	87
10.3 Quadro 3.....	89
10.4 Quadro 4.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

A extinção de espécies de psitacídeos em todo planeta tem avançado rapidamente seja direta ou indiretamente devido às atividades humanas. O aumento sempre crescente pelos recursos naturais aliado às mudanças climáticas e doenças emergentes, tem levado a perdas crescentes na biodiversidade, interrompendo as funções do ecossistema como um todo e afetando severamente a vida selvagem e saúde humana. Isso cria novos desafios para os profissionais que trabalham com conservação (AGUIRRE et al., 2009; VIÉ et al., 2009).

No Brasil encontra-se uma das maiores biodiversidades do planeta, sendo o terceiro país do mundo em número de espécies de aves. Destas, 1524 espécies são residentes e 153 migratórias. Dentre estes números destacam-se os psitacídeos, contendo a maior quantidade em espécies em comparação a qualquer país no mundo.

Do total de 84 espécies de psitacídeos, 13 são classificadas como vulneráveis a criticamente ameaçadas de extinção, 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 reprodução em cativeiro (SNYDER et al., 2000).

A identificação dos agentes etiológicos e do risco que representam para coleções de animais em cativeiro torna-se extremamente útil ao permitir 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).

A maior parte do conhecimento envolvendo aves silvestres baseia-se em estudos retrospectivos de eventos com mortalidade e envolvendo indivíduos ao invés de populações (SPALDING; FORRESTER, 1993).

Estudos sanitários envolvendo populações são importantes para se estabelecer um banco de dados de base para que, quando e onde uma doença ocorra, estas informações sejam úteis para fazer subseqüentes estudos epidemiológicos (STONE et al., 2005).

Um componente integral da conservação atual de animais selvagens é a relocação de espécies definida como introdução, reintrodução, revigoramento e translocação populacional (IUCN, 2002) e comumente referida como projetos de soltura. Indivíduos relocados podem introduzir patógenos em populações sem contato prévio com estes agentes, podendo como consequência ameaçar severamente a saúde da população original (BALLOU, 1993).

Para uma relocação ser bem sucedida a população deve estar livre de patógenos considerados de importância significativa para a espécie em questão e seu status sanitário deve ser conhecido previamente à soltura (GRIFFITH et al., 1993; KARESH, 1995), contudo parte dos projetos de relocação de animais selvagens são realizados sem dados adequados sobre a transmissão de doenças entre animais de cativeiro e espécies nativas, ou em relação ao risco de transmissão no meio ambiente como um todo (MUNSON; COOK, 1993).

Como exemplo de trabalhos já realizados no tema, um estudo envolvendo diversas espécies de psitacídeos de vida-livre foi realizado no México visando diversos patógenos virais, endo e ectoparasitas. As populações deste estudo estão sob grande risco de introdução e transmissão de doenças devido ao fato de que vivem em uma área com grande densidade populacional humana, onde existem granjas de aves de produção, e a soltura/escape de aves de cativeiro sem monitoramento já ocorreu. O estudo estabeleceu que apesar dos riscos em potencial, as aves de vida-livre estavam livres para os patógenos de importância pesquisados (STONE et al., 2005).

Atualmente, o comércio ilegal de vida silvestre, movimenta de 10 a 20 bilhões de dólares por ano (WEBB, 2001). É a terceira atividade ilícita do mundo, depois das armas e drogas. O Brasil participa com cerca de 5% a 15% do total mundial, e estima-

se que o contrabando de animais seja responsável pela retirada anual de milhões de animais silvestres das matas brasileiras (RENCTAS, 2001).

Protocolos de monitoramento sanitário em indivíduos confiscados do comércio ilegal de animais selvagens são vitais para tomarem-se decisões precisas sobre incorporar esses animais em cativeiro, determinar a viabilidade da relocação, ou optar por eutanásia (IUCN, 2002).

Qualquer soltura envolvendo animais selvagens confiscados deve incluir exames prévios e monitoramentos para lidar adequadamente com impactos negativos potenciais, tais como estabelecidos pela IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). Há atualmente uma demanda crescente e urgente por informações e considerações veterinárias em relação à destinação responsável de vida selvagem confiscada (IUCN, 2002).

Um caso de soltura de psitacídeos confiscados bem sucedida é o do criticamente ameaçado Papagaio-das-Ilhas-Margarita (*Amazona barbadensis*) na Venezuela, onde se realizou extensiva pesquisa para agentes infecciosos tais como paramixovírus tipo 1 (Doença de Newcastle), influenza aviária, *Salmonella* spp. entre outros, permitindo a liberação, e posterior contribuição à conservação da espécie ao se comprovar sucesso reprodutivo de alguns indivíduos relocados (SANZ; GRAJAL, 1998).

Segundo a Instrução Normativa 179 oficializada pelo IBAMA em 25/06/2008, determinou-se através dos procedimentos para destinação de animais silvestres confiscados, que diversos protocolos visando a soltura deveriam ser seguidos. Dentre estes destaca-se a realização de inúmeros exames laboratoriais como medidas a se prevenir a introdução de agentes infecciosos no ambiente, e garantir a sobrevivência a longo prazo dos animais dos projetos em questão (BRASIL, 2008 a).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea* - Kuhl, 1820) pertence à Família *Psittacidae*, mede aproximadamente 35 cm e habita as matas secas interioranas, pinheirais, orla de capões de mata entre campos. São encontrados principalmente em porções isoladas da Mata Atlântica ligadas às áreas de florestas de Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*) acompanhando um gradiente altitudinal que começa a partir dos 400m na região sul e vai de 600m a 1600m na regiões sudeste e nordeste do Brasil (MAGALHÃES, 2006).

Fazem dormitórios coletivos, aglomerando vários grupos em uma única árvore, onde podem ser contados até centenas de indivíduos. São capazes de realizar deslocamentos sazonais, possivelmente em escalas regionais, em busca de pinheirais frutificados ou outras fontes alimentares (MACHADO et al., 2008).

O período reprodutivo estende-se geralmente de Setembro à Janeiro (JUNIPER; PARR, 1998) e as aves nidificam em ocos e ramagens de árvores emergentes (*A.angustifolia*, *Parapiptadenia rigida*, *Cedrela odorata*, *Nectandra* spp., *Ocotea* sp.), onde realizam a postura, que pode variar de dois a quatro ovos que são incubados por aproximadamente 25 dias. Os filhotes permanecem no ninho por cerca de 70 dias antes do primeiro vôo (MACHADO et al., 2008).

Sua dependência ecológica de coníferas (*Araucaria* sp. e *Podocarpus* sp.) não está bem definida, embora seja de grande importância para as populações remanescentes na Argentina, RS e SC (JUNIPER; PARR, 1998), e seu desaparecimento coincidente na maior parte da Argentina com o desmatamento parece ter uma correlação direta. O habitat no estado de São Paulo no Parque Estadual de Campos de Jordão é formado em grande parte por *A.angustifolia* e *P.lamberti*, e na reserva do Parque Estadual de Jacupiranga habita uma área em grande parte formada por florestas úmidas ricas em epífitas e bambus (COLLAR, 1992).



Consta como espécie ameaçada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN) (SNYDER et al., 2000) e tem a dúvida distinção de estar presente em todos os levantamentos das Listas Nacionais Oficiais de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Brasileira desde 1968. Tendo permanência nos anos de 1968, 1973, 1989, e 2003, além de estar descrita no anexo I da CITES (MACHADO et al., 2008).

Todas as populações remanescentes estão isoladas em pequenas “ilhas” de habitat sendo severamente afetadas pela fragmentação florestal, ocupação humana ilegal de áreas protegidas, e captura para o tráfico de animais silvestres devido à sua popularidade como animal de estimação (SNYDER et al., 2000).

Anteriormente era bastante abundante e de ampla distribuição, desde a Bahia até o Sul do continente atravessando o Leste do Paraguai até o Norte da Argentina e Rio Grande do Sul, havendo, contudo, dramática redução nas áreas de distribuição e números populacionais devido à destruição em larga escala do habitat para expansão da agricultura e alagamentos para construção de represas (COLLAR, 1992). Em outras épocas era caçado (observando-se raramente casos atuais (COCKLE; BODRATI, 2011), havendo, contudo a ameaça atual continua da captura para comércio ilegal (JUNIPER; PARR, 1998). Seus números declinaram tão dramaticamente que no momento as populações remanescentes se retraíram em pequenos bolsões de habitat (COLLAR, 1992).

Em território nacional a literatura relata que se encontra desde sul da Bahia, oeste do Espírito Santo e localidades dispersas em MG, esporadicamente observados no RJ (provavelmente como visitante sazonal para reprodução), e em São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COLLAR, 1992; JUNIPER; PARR, 1998).

A espécie se tornou atualmente uma espécie rara em quase toda sua área de distribuição original. No Brasil a situação atual é ainda confusa, pois pode nunca ter tido números muito consideráveis na parte setentrional de sua distribuição (apesar de relatos do século XIX contradizerem o fato, COLLAR 1992), mas sem dúvida tendo os

números muito reduzidos e com extinções locais por todo território; sendo considerada próxima da extinção no Rio de Janeiro e Bahia (COLLAR, 1992; MACHADO et al., 2008). Porém nos registros oficiais ainda é classificada como vulnerável no RJ, ameaçada em MG e RS, criticamente ameaçada no ES e em SP (MACHADO et al., 2008), sendo considerada ainda comum em SC (COLLAR, 1992), e com registros visuais na Bahia (LIMA, 2010), porém não oficiais.

Na Bahia, os únicos registros recentes oficiais derivam de espécimes cativos que, segundo um criador, foram capturados de uma população local. Enquanto que no Espírito Santo, observou-se acentuado declínio populacional e era considerado extinto até recentemente, havendo a redescoberta de um bando de até 28 indivíduos no Noroeste deste estado sugerindo deslocamentos sazonais de pequenas populações remanescentes e isoladas (MACHADO et al., 2008; CARRARA et al., 2008).

No Estado de São Paulo, a espécie consta na Lista de Espécies Ameaçadas na categoria criticamente ameaçada (MAGALHÃES, 2006). A população remanescente encontra-se atualmente muito pequena e bastante fragmentada com declínio continuado. No Brasil estima-se que restem de 1.500-2000 indivíduos (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2011).

Foi feita uma contagem de apenas 120 indivíduos em 1992 no Parque Estadual de Campos do Jordão, e uma estimativa de 200 indivíduos no Parque estadual de Jacupiranga em 2006 (WEGE; LONG 1995; MAGALHÃES, 2006).

A captura dos filhotes para o comércio ilegal de aves de estimação e colecionadores não apenas ocasiona a redução populacional, mas também leva a um baixo recrutamento anual, e como consequência a população remanescente envelhece progressivamente diminuindo sua taxa reprodutiva sem que haja novos indivíduos para perpetuação da espécie em longo prazo (BRASIL, 2008b).

O revigoramento populacional, através do *input* de novos indivíduos por meio de solturas responsáveis, representa um fator favorável de auxílio a uma população em declínio e que se encaminha para o colapso. O estabelecimento de indivíduos adultos

reintroduzidos contorna também o período mais crítico de sobrevivência, de predação e de captura, que compõe a fase da postura e eclosão até a saída do ninho para o primeiro voo (BRASIL, 2008b).

Solturas envolvendo espécies de psitacídeos ameaçados encontram-se bem documentadas em literatura (SNYDER, 1994; SANZ; GRAJAL, 1998. COLLAR, 2006). Outro exemplo é a soltura no México envolvendo *Amazona oratrix* e *Amazona viridigenalis* parte confiscados ainda filhotes e outros nascidos em cativeiro legalizado, que passaram por um período de reabilitação de 8 meses realizando-se exames para paramixovírus tipo 1, influenza aviária, entre outros agentes de importância em protocolos sanitários, não detectando-se amostras positivas. A sobrevivência da maioria dos indivíduos monitorados (visualmente e por rádio-colar) até 12 meses após a soltura, incluindo a documentação de sucesso reprodutivo de um casal de *A.oratrix*, demonstrou novamente a viabilidade de tais projetos (PARÁS et al., 2002).

No Brasil somam-se no momento numerosos exemplos de solturas bem-sucedidas de aves confiscadas e também de indivíduos nascidos em cativeiro, tais como Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (SEIXAS; MOURÃO, 2000; LO, 2006; BRASIL, 2010), Jandaia-mineira (*Aratinga auricapilla*) (LIMA; SANTOS, 2006), Arara canindé (*Ara ararauna*) (VALLE; CHAGAS, 2010), Arara-vermelha-grande (*Ara chloropterus*) (LO; SAIDENBERG, 2010), entre muitos outros não publicados.

De fato, um dos primeiros projetos oficiais de soltura de psitacídeos no Brasil foi realizado entre os anos de 1969/1970 na floresta do Parque Nacional da Tijuca (RJ), onde se realizou a reintrodução de espécies então extintas, utilizando indivíduos confiscados do tráfico. A reintrodução de Tiriba-fura-mato (*Pyrrhura cruentata*), Tiriba-de-orelha-branca (*P.leucotis*) e Tiriba-de-testa-vermelha (*P.frontalis*) foi extremamente bem-sucedida, apesar dos métodos pouco desenvolvidos e falta de experiência na época. Após seis anos da soltura, verificou-se que estavam totalmente adaptadas e sucesso reprodutivo era relatado. Se não fosse pelo fato de que nesta época, as duas primeiras espécies fossem sistematicamente capturadas por traficantes, estas ainda estariam presentes no Parque, juntamente com a população atual e crescente de

Tiriba-de-testa-vermelha originária deste empreendimento (COIMBRA-FILHO; SILVA, 1998).

Porém, este assim como outros exemplos de solturas, nem sempre foram realizados seguindo padrões adequados para garantir um *status* sanitário mínimo aceitável das aves a serem relocadas. Tal requisito é de suma importância para melhor analisar os resultados, assim como diminuir os riscos inerentes e possíveis críticas do meio acadêmico em relação a esses projetos (CUNNINGHAM, 1996; COLLAR, 2006).

A avaliação sanitária de *A.aestiva* de vida-livre em uma reserva indígena na Bolívia demonstra a importância de se obter um entendimento sobre as interações de aves de cativeiro e selvagens. Nessa reserva os povos indígenas coletam e vendem psitacídeos capturados no meio selvagem, utilizando-se de papagaios da mesma espécie que funcionam como "iscas". Essa prática, além de ter um impacto ambiental considerável, pois muitas aves morrem na captura ou logo após, também leva a riscos de exposição a doenças nas aves selvagens, principalmente por haver uma interação prolongada entre a ave "isca" e as de vida-livre, e também pelo escape de aves originárias de cativeiro. Nesse trabalho pesquisou-se através de inquérito sorológico uma série de agentes tais como o paramixovírus tipo 1, influenza aviária, *Salmonella enterica* sorovar Pullorum, *Chlamydophila psittaci*, poliomavírus, herpesvírus de psitacídeos tipo 1, vírus da encefalite equina, *Aspergillus* spp., coronavírus e outros de interesse para aves de produção. Obtendo-se títulos significativos para S.Pullorum, tanto em aves de cativeiro como de vida-livre. Contudo, um maior número de aves de cativeiro foram positivas o que poderia indicar uma exposição nos dois grupos pelo contato com aves domésticas, papagaios em cativeiro e humanos, o que leva a um risco considerável para a manutenção das populações selvagens a longo prazo (DEEM et al., 2005).

Casos de graves surtos com grande mortalidade envolvendo psitacídeos começaram a ser relatados em aves importadas de países sul-americanos para a América do Norte e Europa, principalmente entre as décadas de 70 a 90 (RIGBY et al., 1981; MACDONALD et al., 1981; CLAVIJO et al., 2000). Essa prática bárbara de comércio legalizado envolve aves capturadas na natureza que acabam sendo sujeitas a

altos níveis de estresse durante o transporte precário, além do próprio estresse ocasionado pela condição de subitamente serem colocados em cativeiro, um paralelo não muito diferente do tráfico de psitacídeos praticado no Brasil.

Essas condições tornam propícias a manifestação de doenças mantidas em estado portador, assim como a aquisição de diversos agentes infecciosos ao entrar em contato com animais domésticos e humanos. Surtos como esses resultaram em grande número de óbitos no período de transporte e de quarentena, havendo a confirmação de infecções múltiplas por agentes como *Salmonella* spp., poxvírus aviário, Doença de Newcastle, influenza aviária, *Escherichia coli*, entre outros (RIGBY et al., 1981; MACDONALD et al., 1981; CLAVIJO et al., 2000).

Além do fator de bem-estar animal e de ameaça à conservação de inúmeras espécies, esses eventos representam um enorme risco para a indústria de aves de produção, e também sobremaneira no que se relaciona aos aspectos zoonóticos de alguns agentes. Como exemplo, um subtipo de Influenza aviária (H9N2) foi isolado de um carregamento de Ringnecks (*Psittacula krameri manillensis*) enviado do Paquistão para o Japão. Através do sequenciamento de nucleotídeos da hemaglutinina e neuraminidase, pode-se demonstrar 97% de identidade com o subtipo encontrado em casos clínicos em humanos nesse período (MASE et al., 2001).

Casos de vasto número de óbitos envolvendo a Doença de Newcastle (velogênica) são comumente reportados em aves capturadas na natureza (PANIGRAPHY et al., 1993; BRUNING-FANN et al., 1992; CLAVIJO et al., 2000) e constantemente ligados à surtos subsequentes em aves de produção (SEAL et al., 1998).

Em 2006 detectou-se nos Estados Unidos (EUA) um caso positivo para Influenza aviária do subtipo H5N2 em um filhote de Papagaio-diadema (*Amazona autumnalis*), e o subsequente sequenciamento do gene da hemaglutinina e análise filogenética pode agrupar o isolado com a linhagem de subtipos comumente encontrados no México, levando a uma grande possibilidade que a ave tivesse entrado ilegalmente nos EUA,

ainda que atualmente o comércio de aves capturadas na natureza seja proibido nesse país. Esforços no sentido de monitoramento e vigilância epidemiológica foram vistos como medidas essenciais nesse caso para prevenir o alastramento da doença (PILLAI et al., 2008).

Algumas doenças virais de ocorrência esporádica, porém de importância, tal como poxvírus aviário e o coronavírus ainda são pouco estudados em psitacídeos, e o conhecimento sobre o estado portador e sua contribuição para a ocorrência de quadros clínicos ainda são pouco pesquisados.

Partículas virais de Coronavírus já foram descritos em casos envolvendo alterações no sistema digestório incluindo lesões similares à Síndrome de dilatação pró-ventricular (OROSZ et al., 1992; GOUGH et al., 2006), ainda que o agente tenha sido mais recentemente ligado na maior parte dos casos à presença de um bornavírus (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008).

No Brasil relata-se um grave surto de Poxvírus aviário envolvendo principalmente filhotes de papagaios-verdadeiros (*A.aestiva*), porém alguns indivíduos adultos de outras espécies também foram acometidos (incluindo *Amazona rhodocorytha*). As aves pertenciam a criatórios comerciais de aves silvestres havendo grande número de óbitos (mais de 90% dos acometidos pela infecção) (GRESPLAN, 2007; SAIDENBERG et al., 2007). Investigações apontaram para a probabilidade de que esses filhotes tivessem sido capturados na natureza, e anilhados quando ainda suficientemente pequenos para que fossem vendidos como nascidos em cativeiro em condições legais.

Em estudo realizado na Europa, Dorrestein et al. (1985) analisaram 80 amostras de fezes e 466 necropsias de psitacídeos, determinando que bactérias Gram-negativas cultivadas das fezes poderiam ser consideradas patógenos potenciais já que grande parte das aves assintomáticas não as tem como parte da microbiota intestinal. Neste trabalho *Escherichia coli* (*E.coli*) foi isolada em 41% das amostras de fezes de aves sintomáticas 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. Casos de salmonelose foram detectados em uma ave assintomática e de oito necropsias sendo que grande parte das aves originava-se de importação de países da América do Sul, tendo sido capturadas na natureza e transportadas em condições sanitárias precárias.

Um estudo no Brasil com 174 amostras oriundas de psitacídeos assintomáticos, sintomáticos (casos de diarreia, prostração, septicemia) e de necropsias de cativeiro detectou um total de sete amostras caracterizadas como EPEC (*Escherichia coli* Enteropatogênica), tanto em casos clínicos como em aves assintomáticas. Esses resultados demonstraram a presença de cepas com potencial zoonótico assim como riscos em potencial para coleções de zoológicos e criatórios, e para aves envolvidas em programas de relocação (SAIDENBERG, 2009). Outro trabalho no Brasil com 24 amostras de psitacídeos sintomáticos e de necropsias identificou novas amostras de EPEC, neste caso de isolados atípicos, além de outros fatores de virulência de patótipos de *E.coli* (KNÖBL et al., 2011).

Uma pesquisa empregando a técnica da PCR para detecção de *Salmonella* identificou 13.2% (37) amostras positivas de um total de 280 psitacídeos de cativeiro assintomáticos. Todas as aves, incluindo uma espécie extremamente ameaçada, a Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*), tinham o histórico de captura ilegal antes de serem confiscadas e incorporadas em programas de reprodução em cativeiro. Este mesmo trabalho testou novamente as aves que haviam sido positivas dois meses após a primeira coleta resultando numa queda da prevalência (12.5%), demonstrando que havia uma eliminação intermitente entre as aves do plantel (ALLGAYER et al., 2003).

Outro estudo envolvendo amostras de psitacídeos confiscados e fazendo parte de projetos de relocação resultou no isolamento positivo para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em três Papagaios-verdadeiros (*A.aestiva*) das 103 amostras coletadas de diversas espécies de psitacídeos encontradas em um centro de resgate. Este trabalho utilizou amostragens seriadas como parte dos protocolos sanitários pré-soltura, tendo um intervalo de 15 dias entre cada coleta (perfazendo um total de seis), e evidenciando eliminação intermitente para as amostras positivas inicialmente. Também

de importância, foram as repetições realizadas nas aves que coabitavam os mesmos recintos, não se obtendo resultados positivos em nenhuma das ocasiões e permitindo selecionar os indivíduos a participarem do programa de soltura (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2010).

A determinação dos agentes infecciosos previamente citados, em grupos de psitacídeos confiscados (especialmente concentrando-se na espécie *A.vinacea*), que irão fazer parte de projetos de relocação no habitat selvagem, poderia revelar informações adicionais sobre a frequência destes agentes e auxiliar no manejo atual e futuro. Tal estudo também permitiria analisar a viabilidade de protocolos de soltura assim determinados de acordo com a instrução normativa 179/2008 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA).



### 3 OBJETIVOS

- Detectar a frequência de amostras positivas para paramixovírus tipo 1, influenza tipo A, poxvírus aviário, coronavírus, *Escherichia coli* Enteropatogênica, e *Salmonella* spp., em indivíduos da espécie *A. vinacea* confiscados do tráfico e participando de programas de relocação através da técnica da PCR.
- Determinar se houve eliminação intermitente para os agentes detectados em amostragens seriadas.
- Sequenciar as amostras positivas de modo a determinar a similaridade das seqüências de nucleotídeos com amostras já descritas em literatura, e poder inferir uma provável origem em comum, assim como o potencial zoonótico de certos agentes.
- Analisar as práticas de manejo empregadas e fornecer informações às instituições do presente estudo, de modo a promover melhorias e diminuir os riscos envolvidos.
- Discutir a viabilidade e custos da metodologia e seu emprego segundo as determinações da IN 179/2008.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta das amostras**

Foi estabelecido realizar amostragens seriadas, sendo idealmente uma no início de cada projeto enquanto as aves permanecem em viveiros menores/quarentena, outra no período de mudança para os recintos de vôo e a última na área de soltura. Um total de três amostragens, no mínimo, teria como objetivo a tentativa de identificar aves que estejam eliminando intermitentemente o agente. O tempo entre cada coleta foi dependente dos esquemas de contenção e manejo das aves.

Foi feito uso de dois suabes cloacais para cada indivíduo amostrado, o primeiro para cultura bacteriana sendo armazenado em meio de transporte (meio de Stuart, DIFCO®) e mantido a 4°C até o processamento. O segundo suabe para vírus DNA e RNA foi colocado em solução salina tamponada (PBS pH 7.5 - 1000µL) em microtubo de 1.5 mL, e mantido refrigerado até o transporte ao laboratório, sendo submetido a vórtex para homogeneização da amostra e dividido em duas alíquotas de 200 µL (para extração de DNA e RNA respectivamente), mantido congelado a -20°C dentro de duas semanas até o processamento.

### **4.2 Métodos pós-soltura**

As amostras fecais foram obtidas colocando-se sacos plásticos previamente limpos com álcool 70° na parte inferior do recinto de aclimação e/ou ao redor dos comedouros de alimentação suplementar na área, durante o período de adaptação pós-soltura.

### 4.3 Coletas no criatório conservacionista

Originalmente planejava-se fazer todo o projeto em um criatório em São Paulo, onde um número de mais de 40 indivíduos da espécie *A. vinacea* se encontravam em 2009, com o objetivo exclusivo de serem reabilitados para soltura. Contudo, ao se iniciarem as coletas no segundo semestre de 2010 de acordo com o cronograma original, verificou-se que o número real de indivíduos somava apenas 26. Uma pesquisa mais detalhada dos dados do plantel mostrou que o restante das aves veio a óbito por possíveis causas infecciosas. Tendo-se em mente que para garantir que um programa de soltura seja bem sucedido, a população que servirá ao projeto deve possuir ótima saúde, ou no mínimo ter a possibilidade de ser reabilitada adequadamente sem que ocorra mortalidade em níveis altos; foi instituída uma pesquisa paralela em caráter emergencial dos agentes infecciosos que poderiam estar envolvidos assim como das práticas de manejo.

A pesquisa dos agentes infecciosos também foi expandida para outras espécies de psitacídeos encontrados no local, pois a possibilidade de haver transmissão entre as diversas espécies, ainda que fossem mantidos em viveiros separados, era possível. Principalmente pelo fato de haver grande mortalidade igualmente afetando outras espécies em todo o plantel.

Obtiveram-se amostras de suabes cloacais de Papagaios-de-peito-roxo sintomáticos (prostração/diarreia/caquexia) assim como de necropsias, e igualmente de uma variedade de espécies dos outros psitacídeos, sendo testadas para os agentes bacterianos e virais descritos neste projeto, além de exames coproparasitológicos devido ao histórico de verminoses no local.

Os resultados demonstraram haver uma associação entre verminoses e infecções por enterobactérias em todos os casos envolvidos, principalmente por *E. coli* tanto em amostras de necropsia como de aves com sintomatologia clínica. Quatro dos isolados de *E. coli* demonstraram pertencer ao patotipo EPEC sendo sequenciados para

estudos paralelos, embora nenhum tenha sido encontrado afetando a espécie *A.vinacea*.

Devido aos problemas encontrados e à falta de apoio por parte dos proprietários para modificações efetivas visando melhorias e prevenção dos problemas, não se deu continuidade à pesquisa neste local.

#### **4.4 Coletas na ONG R3 Animal**

Em Outubro de 2010 um contato para realizar novas coletas surgiu na forma do projeto em andamento realizado pela ONG R3 Animal, sediada no CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) de Florianópolis (SC). O objetivo deste projeto seria a reintrodução em área de distribuição histórica onde a espécie estava extinta. Agindo em conjunto com o CEMAVE (Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres), o projeto estava reabilitando indivíduos da espécie *A.vinacea* desde Agosto daquele ano para soltura no Parque Nacional das Araucárias, município de Ponte Serrada, extremo oeste de Santa Catarina. Um total de 20 aves foram inicialmente selecionadas, mas por questões de problemas físicos (mau desempenho de vôo por falta de penas) ou comportamentais (aves ainda muito humanizadas), 13 foram incluídas no processo final.

As coletas de amostras biológicas foram dependentes do esquema de contenção para outros procedimentos (anilhamento, pesagem periódica, coleta para outros exames). Contudo, pode-se empregar a metodologia de amostragem seriada ao serem coletadas amostras 37 dias antes da soltura (em 02/12/10), e 30 dias antes (09/12/10), utilizando-se suabes cloacais.

No início de Janeiro de 2011, acompanhou-se o procedimento no qual as aves foram transferidas via caminhão da Polícia Militar Ambiental até o local da soltura, permanecendo no recinto suspenso montado no local para aclimação. Durante a

aclimatação, fezes depositadas sob uma lona colocada no chão do recinto foram coletadas com suabe estéril e armazenadas em meio de transporte assim como coletadas com suabe estéril e colocadas em microtubo contendo PBS. Após o momento da soltura, grande parte das aves permaneceu nos arredores visitando os comedouros de alimentação suplementar ou mesmo adentrando novamente o recinto de aclimatação, o que permitiu novas coletas de fezes depositadas sobre lona/sacos plásticos colocados abaixo dos locais onde as aves se agrupavam.

Esse procedimento foi repetido por mais quatro dias, totalizando sete dias de coletas onde pode-se fazer amostragens seriadas em forma de *pool*. Coletaram-se 15 amostras fecais na área de soltura (período de aclimatação e pós-soltura), sendo armazenadas em refrigeração até o processamento.

Obteve-se um total para este projeto de 26 amostras coletadas de suabes cloacais quando em cativeiro em duas ocasiões e 15 amostras de fezes obtidas na área de soltura durante sete dias totalizando 41 amostras (vide Quadro 2, apêndice A).

#### **4.5 Coletas na Fundação Lymington**

Pode-se dar continuidade ao estudo com parte dos indivíduos de Papagaio-de-peito-roxo em um criatório localizado em Juquitiba - SP, que por intermédio do IBAMA recebeu em Julho de 2011 todos os sobreviventes do criatório conservacionista (um total de 22 do item 4.3), assim como outros originários de centros de resgate e criatórios do estado de São Paulo, somando 29 aves.

Este projeto ainda em andamento teve também por objetivo a reintrodução da espécie em um local onde não era avistada no mínimo há 30 anos.

Foi realizado um período de cuidadosa quarentena devido ao histórico de problemas de saúde de parte das aves no local de onde foram resgatados. Foram feitas

a primeiras coletas de suabes cloacais ao adentrarem o local para quarentena (Julho 2011), seguindo-se a coleta durante o período aclimação no recinto intermediário (Setembro 2011), e a terceira coleta na mudança para o recinto de voo (Novembro 2011), havendo dois meses de diferenças entre coletas.

As aves foram soltas em Março de 2012 após permanecerem sete meses em aclimação na própria área do criatório de 36 hectares de habitat reflorestado e protegido.

As coletas das aves soltas e das restantes ainda em cativeiro (oito indivíduos sendo reavaliados em relação ao comportamento ou à condição de voo) se iniciaram logo após a liberação (quatro meses após a última amostragem em cativeiro), tendo igualmente dois meses de intervalo entre si. Nesse período pós-soltura se obtiveram cinco coletas de aves libertas e duas das ainda em cativeiro através de suabes cloacais, vide Quadro 2 (apêndice A).

As amostras obtidas (fezes) das aves soltas foram coletadas de maneira indireta, utilizando-se lonas limpas com álcool e colocadas abaixo do viveiro e comedouros de alimentação suplementar. O número de aves permaneceu no local aproximadamente constante após a soltura o que permitiu a coleta seriada, e nos 7 a 10 meses seguintes as aves foram expandindo gradualmente o uso da área e diminuindo as visitas aos comedouros de alimentação suplementar.

Ao final juntando-se todas as coletas obteve-se 103 suabes cloacais e 48 amostras fecais, totalizando 151 amostras deste projeto.

#### 4.6 Controles positivos

Os controles positivos bacterianos para *Salmonella* spp. e *E.coli* foram obtidos a partir da coleção disponível no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-USP, já sendo comprovadamente positivos para os genes a serem pesquisados pela PCR obtidos a partir de amostras de casos clínicos.

Os controles positivos virais foram obtidos a partir de vacinas comerciais liofilizadas ressuspensas em PBS:

- Avinew® – Merial - Vacina contra a Doença de Newcastle (paramixovírus tipo 1).
- Bioral H - 120® – Merial - Vacina contra a Bronquite Infeciosa (coronavírus).
- Diftovax® – Merial - Vacina contra a Bouba Aviária (poxvírus).
- Fluvac® Innovator EHV 4/1 – Fort Dodge - Vacina contra rinopneumonite e influenza tipo A.

## 5. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas foram processadas seguindo-se o prévio armazenamento refrigerado para as culturas bacterianas, e congelamento para agentes virais sendo processadas como se segue.

### 5.1 Cultura bacteriana e identificação bioquímica

Para a pesquisa de *E.coli* os suabes foram imersos em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, DIFCO®), incubando-se a 37°C por 24 horas, seguido 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).

Para o isolamento de *Salmonella* spp. o suabe foi imerso em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo de Tetrionato (Becton Dickinson and Company®) e incubados por 24 horas a 37°C, seguido de semeadura em ágar Xilose-lisina-tergitol (DIFCO®) e incubados por 48 horas a 37°C. No caso de haverem colônias suspeitas produtoras de H<sub>2</sub>S, para confirmação estas seriam submetidas à análise bioquímica empregando os meios EPM-Mili-Citrato de Simmons (FALCÃO, 2000).

### 5.2 Extração do DNA bacteriano e viral e RNA viral

Cada amostra de uma colônia isolada e confirmada como *E.coli* foi ressuspensa em 200µL de PBS (pH 7.5), e dando-se continuidade com o método de extração de DNA descrito por Boom et al. (1990).



Para melhor descartar a possibilidade de não haver positividade para *Salmonella* spp., em adição à cultura e isolamento em placa, foi empregada a extração de DNA diretamente a partir do caldo de tetrionato após incubação a 37°C, seguindo o trabalho realizado com amostras de aves selvagens realizado por Sareyyupoglu et al. (2008). Este trabalho obteve uma maior sensibilidade testando-se por PCR as amostras a partir do caldo seletivo ao se comparar com os métodos tradicionais de cultura e isolamento.

As amostras para PCR de *Salmonella* spp. foram processadas retirando-se 500 µL de cada amostra original em caldo, centrifugadas a 12.000g (5 minutos), para separar os sedimentos e selecionando 200 µL do sobrenadante para extração de DNA pelo método de Boom et al. (1990).

A suspensão para extração do material genético viral foi obtida através da centrifugação do microtubo contendo 200 µL de amostra (12.000g/30 min/4°C) para vírus RNA e o mesmo procedimento com 20 minutos de centrifugação para DNA, sendo extraído conforme o método de Boom et al. (1990) para Poxvírus aviário e o método de extração utilizando TRIzol (Invitrogen®) para vírus RNA.

Os péletes obtidos na extração para os vírus RNA foram ressuspensos em água ultra pura contendo dietilpirocarbonato para torná-la livre de RNases, e para Poxvírus, ressuspensos em solução de TE, armazenados a -20°C até o processamento.

### **5.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de EPEC, para *Salmonella* spp.**

Para a reação da PCR para detecção o gene de fator de virulência comum a *E.coli* Enteropatogênica (gene *eae* e *bfp*) utilizaram-se os *primers* e protocolo de reação descritos por Aranda et al. (2007).

Para detecção de gene *invA* presente em *Salmonella* spp. utilizou-se o protocolo descrito por Rahn et al. (1992). As sequencias encontram-se descritas no Quadro 1 do Apêndice A.

#### **5.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para vírus DNA**

Os *primers* e protocolos de reação descritos para o gene *4b* (região conservada e comum a grande parte dos Poxvírus aviários) de acordo com Lueschow et al. (2004), funcionaram adequadamente amplificando o controle positivo da cepa vacinal. As sequencias dos *primers* e tamanho dos amplicons encontram-se descritas no Quadro 1 do Apêndice A.

#### **5.5 Reação em cadeia pela polimerase através da transcriptase reversa (RT-PCR) para vírus RNA**

A RT-PCR foi realizada utilizando-se os *primers* e protocolos previamente descritos por Tiwari et al. (2004) para a proteína de fusão de Paramixovírus tipo 1, o trabalho de Poddar (2002) para o gene da Matriz encontrados em vírus da Influenza tipo A, e o trabalho de Escutenaire et al. (2007), para detecção de Coronavírus (tipo 1, 2 e 3, gene *1b*), empregando-se as enzimas M-MLV Reverse Transcriptase® e Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) tal como recomendado pelo fabricante. As sequencias dos *primers* e tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se descritas no Quadro 1 do Apêndice A.

## 5.6 Detecção do amplicon

A detecção do produto amplificado foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1.5% contendo 0.5 µg de brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, identificando os fragmentos de interesse utilizando-se tamanhos de peso molecular de 100 bp e de 1000 bp (Invitrogen®).

## 5.7 Sequenciamento de DNA

Embora não se tenha detectado amostras positivas para os agentes pesquisados em *A.vinacea* e conseqüentemente não se tenha dado continuidade à parte de sequenciamento realizou-se o sequenciamento das amostras de EPEC encontradas no criatório conservacionista como um auxiliar desta pesquisa para análise dos riscos envolvidos e futura publicação paralela no assunto, tal como se segue.

## 5.8 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA

A purificação das amostras positivas para o gene *eae* foi realizada utilizando-se o kit para purificação *GFXPCR DNA and gel band Purification Kit* (GE Healthcare®), sendo o DNA purificado e quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen®) segundo instruções do fabricante. O material purificado foi em seguida armazenado a -20°C para a realização da reação de sequenciamento.

A reação consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems®), 4 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems®), 4pmol de cada primer em reações separadas, 30ng do DNA alvo e água ultra-pura esterilizada q.s.p. para uma reação

final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) para 35 ciclos de 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/25 minutos, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5 minutos e secando-se o precipitado.

Após esta etapa, as sequencias foram resolvidas em sequenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems®).

### **5.9 Edição de sequencias**

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequencias senso e anti-senso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred *online* em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos).

A seguir, os cromatogramas são conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (1998-2002 Technelysium Pty LTD®) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciada.

A sequencia final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do sequenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

## 5.10 Análise filogenética

A árvore filogenética para as sequências de nucleotídeos foi gerada após o alinhamento das mesmas com sequências homólogas recuperadas dos Genbank utilizando-se o método CLUSTALW com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

O alinhamento assim obtido foi utilizado para a geração da árvore de distância, com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* com 1000 repetições de *bootstrap* utilizando-se o programa Mega 4 (TAMURA et al., 2007).

## 6 RESULTADOS

Das amostras testadas para os agentes com potencial infeccioso pesquisados nos dois projetos, obtiveram-se apenas resultados positivos para *E.coli* e confirmadas pela identificação bioquímica, embora nenhuma tenha sido caracterizada como EPEC, totalizando 36 isolados. Os resultados para este agente de acordo com cada instituição podem ser observados no Quadro 2 do apêndice A.

### 6.1 ONG R3 Animal

Foram obtidas um total de 41 amostras da ONG R3 Animal. Durante o período de reabilitação em cativeiro totalizaram-se 26 amostras dos mesmos indivíduos e 15 amostras fecais não caracterizadas individualmente no período de aclimação e pós-soltura.

Para a primeira coleta um total de 10 amostras foram positivas nas culturas para *E.coli*. Para a segunda amostragem apenas uma amostra foi positiva para *E.coli*., e na terceira amostragem, a campo com amostras de *pool* de fezes, não houve resultados positivos nas culturas para *E.coli* (vide Quadro 2, apêndice A).

O Quadro 3 no apêndice descreve as aves individualmente (suabes) e cada resultado de acordo com o esquema de coletas.

Do total das 11 amostras de *E.coli*, não se obteve amplificação para os genes pesquisados para EPEC a partir das culturas obtidas.

O percentual de amostras positivas em relação a cada coleta pode ser visualizado na Tabela 1 a seguir na página 50.

Segundo a análise estatística pelo teste do  $X^2$  utilizando-se o programa GRAPHPAD INSTAT (1993) nas amostras obtidas, observou-se um resultado muito significativo para o decréscimo no isolamento de *E.coli* entre a primeira e segunda amostragem ( $P=0.001$ ).

Não foram encontrados resultados positivos para *Salmonella* spp. durante as coletas tanto em culturas como na PCR a partir do caldo de tetracionato.

Não se encontraram aves portadoras para os agentes virais testados nas amostras obtidas por suabes assim como das amostras fecais da área de soltura.

## 6.2 Fundação Lymington

Obtiveram-se um total de 151 amostras somadas em todas as coletas seriadas. Das aves em cativeiro somaram-se 103 amostras de suabes cloacais, e das aves soltas 48 amostras de fezes não individualmente caracterizadas.

O único agente com potencial infeccioso detectado nas coletas seriadas foi *E.coli*, porém não foi detectado o gene *eae* e *bfp* para EPEC.

Para as amostras obtidas no primeiro lote obtiveram-se oito amostras positivas para *E.coli*. Na segunda amostragem foram sete, seguidas da terceira antes da soltura que resultou em duas amostras positivas (vide Quadro 2, apêndice A).

Seguiram-se mais duas coletas de suabes cloacais das oito aves ainda em cativeiro (concomitante a quinta e sexta coletas de *pool* de fezes das aves soltas a seguir), resultando em nenhum isolado para este agente.

No pós-soltura (vide Quadro 2, apêndice A), a coleta de fezes resultou em cinco positivos para *E.coli* de 18 amostras, seguidas a cada dois meses de intervalo, com a coleta de 16 amostras (oito suabes e oito fezes) com dois positivos para amostras de

fezes; 14 amostras (oito suabes e seis amostras fecais) com nenhum positivo; nove amostras de fezes e nenhum positivo novamente, e terminando com a última coleta de fezes com sete amostras e um positivo.

No total contando-se todas as coletas obteve-se 25 isolados de *E.coli*. O Quadro 4 no apêndice A descreve as aves individualmente (suabes) e cada resultado segundo o esquema de coletas.

O percentual de amostras positivas em relação a cada coleta pode ser visualizado na Tabela 1 (página 50).

A aplicação do teste do  $X^2$  aos resultados das coletas não demonstrou haver resultados significativos (GRAPHPAD INSTAT, 1993), independente de serem comparados apenas os suabes de cloacas ou estes em conjunto com o pool de fezes; portanto aplicou-se a média entre as amostragens resultando em 14,15%, com um desvio padrão de  $\pm 11,48$ .

Não se obteve tampouco amostras positivas para *Salmonella* spp. tanto nas culturas como na PCR, assim como resultados negativos para os agentes virais pesquisados e, por conseguinte não se deu continuidade à parte de sequenciamento.

### 6.3 Amostras de EPEC sequenciadas

Os resultados do sequenciamento demonstraram que as quatro amostras para EPEC de psitacídeos em cativeiro, que eram então contactantes dos Papagaios-de-peito-roxo, agruparam-se com amostras tanto de *E.coli* como de *Escherichia albertii* positivas para o gene *eae*. Estas sequencias disponíveis no *Genbank* foram originárias de uma diversidade encontrada tanto em casos clínicos como assintomáticos em diversas espécies animais, havendo o alinhamento com amostras humanas, animais domésticos e de aves selvagens.



A árvore filogenética foi organizada alinhando-se os isolados com amostras publicadas no *Genbank* a partir da busca das sequencias dos próprios isolados, dando-se atenção a resultados com alto escore e que fossem descritos em aves selvagens e de casos humanos, devido a estes serem os principais grupos envolvidos numa provável transmissão aos psitacídeos confiscados então mantidos no criatório conservacionista. As análises foram feitas a partir da região 2448 a 2926 do gene *eae*. Os altos valores de *bootstrap* obtidos indicam uma confiabilidade na árvore construída (Figura 1 a seguir).

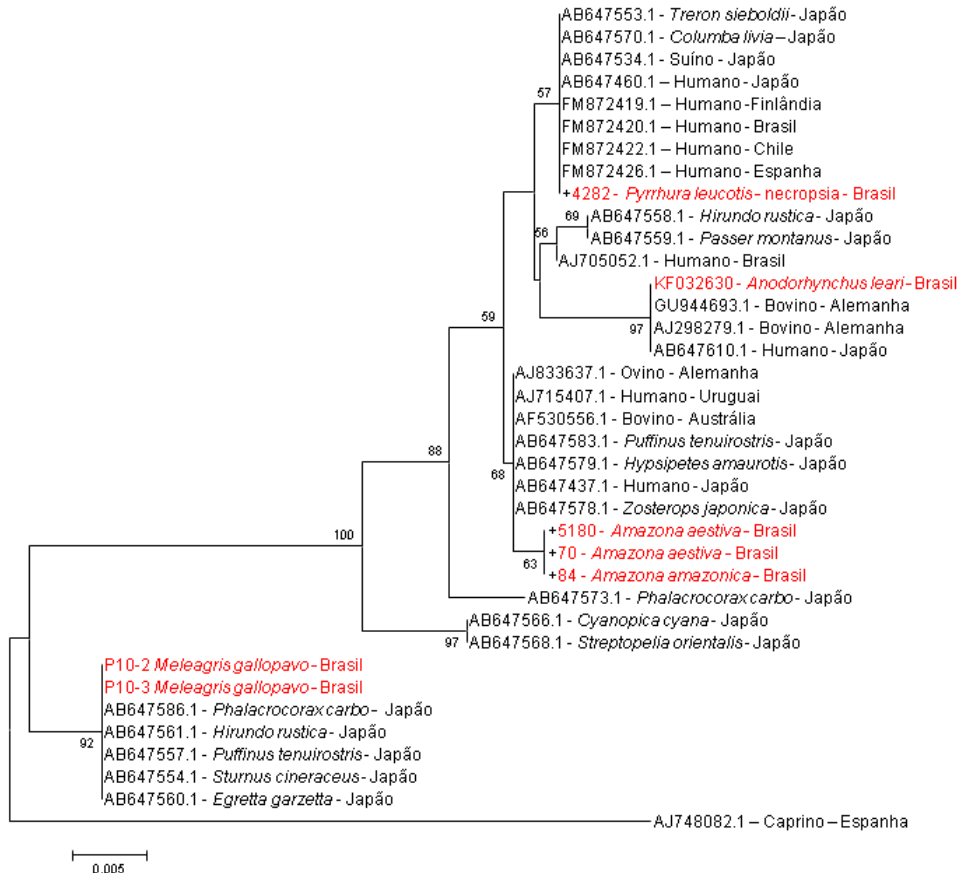


Figura 1. Árvore filogenética gerada através da análise das sequencias obtidas do gene *eae* de psitacídeos em cativeiro contactantes de *Amazona vinacea* (amostras identificadas com +), a partir da análise de distância com o algoritmo Neighbor-Joining e 1000 repetições de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* acima de 50 são demonstrados.

No caso das amostras 5180, 70, e 84 (casos clínicos) estas demonstraram ser completamente idênticas entre si, enquanto que a amostra 4282 de uma necropsia Tiriba-de-orelha-branca (*Pyrrhura leucotis*), agrupou-se com amostras de suíno assintomático, casos clínicos em humanos, e em aves sinantrópicas encontradas mortas.

A matriz de similaridade calculada foi calculada entre estes dois grupos de isolados de psitacídeos utilizando-se a ferramenta *Sequence Identity Matrix* do programa Bioedit (HALL, 1999), resultando em 99,3% de identidade. Ao comparar-se com a única amostra de eae isolada de psitacídeo disponível no *Genbank* (Arara-de-lear assintomática), a amostra 4282 de necropsia apresentou 98,9%, e o grupo de aves sintomáticas 98,7% de identidade respectivamente. O menor valor obtido de identidade para a amostra 4282 foi de 92,9% em relação à amostra AJ748082.1 originária de um caprino saudável. O menor valor para o grupo de aves sintomáticas foi igualmente para esta amostra de caprino com escore de 96,2%.

**Tabela 1. Quantidade de isolados para *Escherichia coli* e porcentagem em relação a cada coleta (suabes/fezes) para *Escherichia coli* nas duas instituições estudadas**

Coletas	ONG R3 Animal		Fundação Lymington	
	N/total	%	N/total	%
1º coleta	10/13	76,9	08/29	27,6
2 º coleta	01/13	7,7	07/29	24,1
3º coleta	00/15	0,0	02/29	6,9
4º coleta	-	-	05/18	27,8
5º coleta	-	-	02/16	12,5
6º coleta	-	-	00/14	0,0
7 º coleta	-	-	00/09	0,0
8 º coleta	-	-	01/07	14,3

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Discussão sobre os agentes pesquisados

A partir dos resultados obtidos neste trabalho torna-se difícil comparar exatamente os resultados com outros encontrados na literatura, devido a que os estudos disponíveis tem mais como foco a parte de sobrevivência, comportamento, genética, e reprodução de psitacídeos em programas de relocação do que em relação a exames sanitários. Aqueles que mencionam os exames realizados variam muito nas metodologias e protocolos empregados (BERRY, 1998; SANZ; GRAJAL, 1998; ROONEY et al., 2001; PARÁS et al., 2002; BRIGHTMITH, 2005; LIMA; SANTOS, 2005; BUTRON; BRIGHTMITH 2010).

Pode-se comparar com os resultados obtidos com diversas espécies de psitacídeos de vida livre, que teoricamente são hígidos estando em equilíbrio com possíveis agentes infecciosos no estado portador, poderia-se inferir o que seria normal e aceitável para comparação de modo a incluir, tratar, ou excluir candidatos para programas de relocação. Embora estes estudos também não sejam numerosos e variem em suas metodologias, os existentes, como por exemplo, o realizado no Peru com espécimes adultos (*Brotogeris sanctithomae* e *Aratinga weddelli*) demonstrou entre os vários outros agentes pesquisados testados, nenhum resultado positivo para paramixovírus tipo 1 no teste por inibição da hemaglutinação (GILARDI et al., 1995).

Igualmente uma baixa prevalência de resultados foi obtida no México ao se testar 41 filhotes de quatro espécies diferentes durante o período de estudo (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*, *Amazona oratrix*, *A. viridigenalis*, *A. autumnalis*), com resultados negativos na inibição da hemaglutinação para paramixovírus tipo 1 e influenza tipo A (STONE et al., 2005).

Culturas para *Salmonella* spp. foram feitas tanto de araras em cativeiro e liberadas quanto de psitacídeos selvagens presentes na reserva de Tambopata no Peru. Nenhuma amostra resultou ser positiva, ainda que em um trabalho anterior uma das aves de cativeiro tivesse título positivo para *S. Pullorum*. Em contraste, nas comunidades locais ao redor da reserva, amostras positivas foram facilmente obtidas de galinhas e patos domésticos (BRIGHTMITH et al., 2010).

Também já se relatou a presença de um filhote de Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre encontrado morto e positivo para *Salmonella enterica* sorovar Bredney, (VILELA et al., 2001) e de um filhote assintomático para *Salmonella enterica* sorovar Braenderup (ALLGAYER et al., 2009), assim como adultos assintomáticos da espécie *A. aestiva* já tendo contato com o agente através de inquéritos sorológicos em comunidades indígenas na Bolívia (DEEM et al., 2005).

Um estudo preliminar com filhotes de Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*) assintomáticos em vida-livre testou 13 amostras de suabes cloacais pela PCR para paramixovírus tipo e influenza tipo A, além de poxvírus aviário, coronavírus, culturas e PCR para *Salmonella* spp. e *E. coli* Enteropatogênica. Os resultados demonstraram ausência de todos os agentes, com exceção de uma amostra positiva para EPEC atípica (*eae* +, *bfp* -) (SAIDENBERG et al., 2012a, b).

Portanto, embora acabe-se por extrapolar resultados no que diz respeito à comparação muito variada de metodologias e espécies envolvidas, um padrão pode ser observado nos estudos existentes, em relação à uma baixa frequência da maior parte dos agentes aqui estudados em aves assintomáticas em vida-livre.

Os resultados positivos para *Salmonella* spp. encontrados em outros trabalhos em cativeiro utilizando a PCR de culturas seriadas de suabes cloacais demonstram uma frequência muito maior do que a obtida no presente estudo (ALLGAYER, 2003; MARIETTO-GONÇALVES et al., 2010a, b). Uma possibilidade em relação a este e os outros agentes pesquisados poderia ser que as amostragens de aves em programas de relocação acabaram por ser invariavelmente enviesadas, pois os indivíduos destas

instituições em particular, já haviam sido escolhidos para o programa de soltura, e, portanto, haviam passado por uma triagem inicial estando teoricamente saudáveis, ainda que não avaliados com exames laboratoriais, contando apenas com exame físico.

No presente estudo observou-se uma tendência para maior detecção de *E.coli* nas amostragens iniciais em comparação com as finais, especialmente levando-se em conta quando as amostras foram coletadas de aves já libertas (Quadro 2).

Os resultados das culturas, particularmente à baixa ocorrência de *E.coli* e inexistência de EPEC, demonstram a importância e eficácia da implantação de boas condições de manejo tal como observado em outras instituições (MATTES et al., 2005), ainda que a longo prazo, a implementação de mudanças estruturais mais permanentes nos centros de resgate sejam sempre recomendadas, tais como o controle de superlotação e acomodação dos animais em viveiros suspensos; medidas estas indicadas para prevenção e disseminação de uma ampla variedade de doenças infecciosas que afetam psitacídeos, não apenas para enterobactérias. No início das coletas, problemas causados também por parasitas intestinais afetavam gravemente os animais no criatório conservacionista (antes da transferência) e ONG R3 Animal, buscando serem solucionados com a mudança no manejo ao se cortar o ciclo de reinfestações/reinfecções.

Na ONG R3 Animal os recipientes de comida e água eram anteriormente oferecidos ao nível do solo, ou mesmo o alimento era colocado diretamente no solo. Este tipo de manejo, além de ser errado do ponto de vista comportamental para as espécies (aves do gênero *Amazona* raramente vêm ao solo para se alimentar), também fazia com que tivessem contato com o substrato do recinto (areia) no qual havia um acúmulo diário de dejetos e restos de alimentos. Várias aves também acabavam por ingerir alimentos deteriorados como sobras das alimentações anteriores.

Assim como havia sido observado anteriormente no criatório conservacionista, o substrato do recinto que não permite uma limpeza completa diária predispõe as aves a infecções e infestações parasitárias num círculo vicioso. Exames coproparasitológicos

também foram coletados deste local resultando em positividade para *Capillaria* spp. (e vermifugadas de acordo). Face à dificuldade em promover uma reforma imediata dos recintos (transformando-os em viveiros suspensos ou no mínimo cimentar para permitir uma lavagem diária dos restos de alimentos/dejetos), procurou-se modificar a apresentação dos alimentos muito acima do solo. Sabe-se que psitacídeos saudáveis podem ser capazes de eliminar bactérias Gram-negativas não pertencentes à microbiota desde que as condições de manejo sejam aprimoradas (GLÜNDER, 2002; STANFORD, 2003). Os resultados das culturas parecem ter demonstrado a viabilidade da mudança do manejo como medida temporária embora mudanças nos centros de resgate sejam indicadas para prevenção de doenças infecciosas a longo prazo.

A importância da modificação no manejo pode ser compreendida principalmente no caso da ONG R3 Animal, onde se observou um decréscimo estatisticamente significativo com as mudanças empregadas ( $P=0.001$ ). Esse decréscimo não foi observado de maneira tão abrupta na Fundação Lymington, o que leva à possibilidade de que ao se obter amostras com percentual inicial já baixo, as medidas de manejo adicional não resultam em mudanças expressivas na redução de *E.coli*.

Outro fator que pode ter contribuído no decréscimo para o isolamento de *E.coli* seria também a presença de probióticos presentes na ração extrusada, oferecida juntamente com os outros alimentos.

Porém o fato mais importante é que grande parte das aves na Fundação Lymington estavam anteriormente em contato com cepas de EPEC circulantes no criatório conservacionista. Embora estas não tenham sido detectadas em *A.vinacea*, a mudança no manejo empregado já ao adentrarem a Fundação para quarentena, permitiu que ao se iniciar as coletas para esse projeto, as culturas positivas para *E.coli* tivessem seu número reduzido. Ainda que esse resultado não tenha sido tão significativo segundo a análise estatística e mantendo-se a média dos resultados (14,15%), entre as amostragens, independente de serem amostras de suabes ou de *pool* de fezes. Independentemente disso, o fato principal a se considerar seria a diminuição do risco de aparecimento de problemas relacionados a esse agente durante

o processo de reabilitação e preparo para soltura como um todo. Tal como antes era observado no criatório conservacionista onde havia grande mortalidade causada também por este agente.

Com relação ao sequenciamento das amostras obtidas das aves em cativeiro, contactantes dos *A. vinacea*, embora não façam exatamente parte deste trabalho por envolverem outras espécies que não o Papagaio-de-peito-roxo; é interessante o fato de que mesmo agrupando-se em diferentes grupos filogenéticos, a identidade entre os isolados dos psitacídeos sintomáticos e da amostra de necropsia foi de 99,3%. A homologia destas amostras também com isolados de casos clínicos humanos disponíveis no Genbank parece reforçar a possibilidade de que humanos sejam em grande parte fontes de infecção para aves mantidas sem cuidados sanitários, e estas também passarem a ser fontes de infecção para um agente com potencial zoonótico. Mesmo em relação a amostras disponíveis no Genbank de outras aves selvagens, estas foram coletadas em aves sinantrópicas encontradas mortas por causas desconhecidas, o que recai a suspeita de que nestes casos os humanos, ainda que indiretamente por ação no ambiente (lixões, esgotos, etc.), possam estar envolvidos na transmissão para estas espécies.

Também é interessante notar que estes isolados, dos contactantes, se caracterizaram como EPEC típicas ao possuírem o gene *bfp* (*eae* +, *bfp* +). EPEC típicas são mais frequentemente descritas em humanos e animais de estimação, sendo os humanos reservatórios naturais reconhecidos para esse patotipo (TRABULSI, 2002), e que em diversas espécies de aves os isolados são em grande parte atípicos (KOBAYASHI et al., 2002; LA RAGGIONE et al., 2004; KRAUSE et al., 2005; PEDERSEN et al., 2006). Em psitacídeos encontram-se descritos isolados típicos e atípicos (SCHREMMER et al., 1999; KNÖBL et al., 2011; SAIDENBERG et al., 2012 c). A presença de cepas típicas parece reforçar em mais um grau o contato com humanos, além das evidências do sequenciamento dos contactantes de *A. vinacea*.

Embora nenhuma das amostras tenha sido positiva para o patotipo EPEC na PCR para *A. vinacea*, os resultados positivos para EPEC típica em psitacídeos



assintomáticos encontrados em cativeiro (SAIDENBERG et al., 2012 c), e de EPEC atípica em vida livre (SAIDENBERG et al., 2012b), trazem à tona não somente a questão da possível aquisição ao entrar em contato com animais domésticos e humanos direta e indiretamente, mas principalmente a manutenção de um estado portador em equilíbrio com um possível patógeno. Comparando-se com aves que poderiam ser positivas para esse agente e estando em um programa de reabilitação, o achado positivo em um indivíduo assintomático não seria um impeditivo para a sua liberação, restando a questão de se decidir em fazer um tratamento preventivo ou não. No caso de um indivíduo sintomático, obviamente este não poderia ser solto, pois suas chances de sobrevivência enquanto doente seriam mínimas, porém após tratamento e sendo testado novamente, a ave poderia continuar como candidata.

Constatou-se a presença de estado portador para *E.coli* em determinados indivíduos durante as amostragens (Quadro 4.), embora não se pudesse caracterizar individualmente as amostras das aves já soltas, alguma destas poderia ser responsável pelos resultados positivos nas coletas finais.

O resultado de uma amostra positiva mesmo no último estágio do processo de reabilitação, como observado no caso das amostras de *pool* das aves já soltas da Fundação Lymington, indica a possibilidade da manutenção de estados portadores e/ou a necessidade adicional de se procurar um aperfeiçoamento do manejo no pós-soltura.

Outro trabalho realizado no Brasil envolvendo psitacídeos confiscados em fase de reabilitação para posterior soltura na natureza relatou a presença de inúmeras aves assintomáticas positivas para *E.coli* (não caracterizada em patótipos) e uma positiva para *S.Enteritidis*. Os autores basearam-se em outros trabalhos publicados anteriormente que estabelecem que estes microrganismos não fazem parte da microbiota e podem acarretar riscos (MATTES et al., 2005), para iniciar o tratamento com antibióticoterapia de acordo com o perfil de antibiograma. Contudo, a ave positiva para *S.Enteritidis* foi removida do programa de soltura por ainda se considerar um risco para os outros indivíduos em cativeiro e no meio ambiente (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2010 a, b).

Embora não se caracterize como um estudo de aves de vida livre, de 22 amostras obtidas de filhotes recém capturados de Papagaios-verdadeiros (*A.aestiva xanthopteryx*) na Argentina, obteve-se uma positiva na inibição da hemaglutinação para influenza tipo A para a qual os autores deduziram ser de subtipo de baixa patogenicidade (FERREYRA et al., 2008). No entanto, esse resultado demonstra o contato com um agente com potencial patogênico de importância, fato que não impediu a exportação legalizada do grupo de indivíduos para países europeus, uma prática que felizmente entrou em declínio com a proibição na importação pela União Européia. Este resultado não só corrobora com a baixa frequência relatada deste agente em psitacídeos, mas também chama a atenção para os relatos descritos causando surtos com grande mortalidade e impacto econômico/sanitário devido à extrema situação de estresse na qual essas aves são submetidas neste tipo de comércio (MASE et al., 2001; PILLAI et al., 2008).

Nos EUA, um filhote de Papagaio-diadema (*A.autumnalis*) contrabandeado vindo do México e apresentando sintomatologia de prostração e diarreia, resultou positivo para o subtipo H2N2 para influenza aviária de baixa patogenicidade. Apesar de que o protocolo para aves positivas nos EUA tipicamente resulte em eutanásia, buscou-se uma alternativa instalando-se medidas rígidas de quarentena e diversas repetições para PCR em tempo real e isolamento viral para confirmar se ainda era positivo. O filhote recebeu tratamento de suporte e pode se recuperar da infecção sendo liberado da quarentena após 9 semanas sendo testados duas vezes e obtendo-se resultados negativos. Esse trabalho demonstra como mesmo num caso que geraria pânico nas autoridades sanitárias além da imediata destruição da ave, a combinação de testes e quarentena pode auxiliar na decisão de manutenção da ave sem trazer consequências negativas (HAWKINS et al., 2006).

No Brasil, em anatídeos e galiformes domésticos criados de maneira extensiva e em aves silvestres, incluindo migratórias; de 1022 amostras de suabes traqueais e cloacais testados pela PCR em tempo real para paramixovírus tipo 1, apenas sete foram positivas (sendo cinco de aves domésticas), sendo caracterizadas como cepas

lentogênicas (THOMAZELLI et al., 2012). O que demonstra que mesmo em espécies reconhecidamente capazes de serem portadoras assintomáticas, a frequência é consideravelmente baixa nas populações estudadas disponíveis até o momento.

Sabe-se através de estudos de inoculação experimental que psitacídeos, inoculados com cepas velogênicas de Paramixovírus tipo 1 isolados originalmente de psitacídeos contrabandeados para os EUA, permanecem excretando o vírus por mais de um ano após a inoculação (ERICKSON et al., 1977), de modo que teoricamente um psitacídeo que tenha estado em contato com o agente poderia ser detectado durante o período de reabilitação. Isso é especialmente verdadeiro durante as fases de variações onde fatores de estresse não propositais (mudança de ambiente, contenções físicas, interações sociais, adaptação ao clima, etc.) poderiam fazer com que agentes mantidos no estado portador viessem a ser eliminados de maneira intermitente.

Comparativamente, os resultados negativos para influenza e paramixovírus tipo 1 aqui obtidos, e também para os outros agentes nas aves do presente estudo, podem demonstrar que independente da presença de possíveis portadores, que mesmo com amostragens seriadas podem não ter sido detectados, uma preocupação maior com o manejo das aves durante a reabilitação resulta ser tão efetivo e importante quanto a triagem através de exames laboratoriais.

O poxvírus aviário tem sido citado causado surtos com grande mortalidade em psitacídeos, especialmente aqueles recém-capturados e sob grande estresse (MACDONALD et al., 1981; GRESPAN, 2007; SAIDENBERG et al., 2007), embora a sua detecção em portadores fora da situação de surto seja muito rara. A via de transmissão em passeriformes, através de poleiros de exibição onde machos se apresentam para fêmeas e que são utilizados ano após ano, foi mencionada como uma maneira de que partículas virais permaneçam no ambiente e permitam a reinfecção sem a participação direta de vetores (TIKASINGH et al., 1982).

A forma de manutenção do poxvírus circulante em psitacídeos independentemente de vetores ainda é desconhecida, pois os vírus que afetam

psitacídeos parecem ser extremamente exclusivos, a ponto de serem espécie específicos (MACDONALD et al., 1981; BOOSINGER et al., 1982; GONZALEZ-HEIN et al., 2008), havendo a possibilidade que sejam eliminados intermitentemente através do trato gastrointestinal, pele e penas além da reconhecida participação de vetores mecânicos (RITCHIE; CARTER, 1995). O fato de este agente não ter sido encontrado nas amostragens seriadas assim como o não relato de surtos recentes, especialmente nestes centros de resgate, demonstra o quão pouco ainda se conhece sobre este vírus em psitacídeos.

Para o coronavírus aviário, no Brasil o seu achado corrobora com relatos do exterior onde tem sido descrito em aves aquáticas e galiformes selvagens assintomáticos (MURADRASOLI, et al., 2010; RIVA et al., 2010; CHU et al., 2011). O seu relato esporádico em psitacídeos parece confirmar uma baixa frequência do agente, ainda que o seu envolvimento em casos de síndrome de dilatação de pró-ventrículo deva ser mais pesquisado (OROSZ et al., 1992; GOUGH et al., 2006).

Embora os resultados desta pesquisa possam ser confrontados com outros projetos de relocação realizados com psitacídeos, existe uma grande variedade nas metodologias devido à tecnologia disponível no momento, requerimentos governamentais, espécies envolvidas e patógenos predominantes, assim como inevitavelmente a questão dos custos envolvidos.

Na América Latina pode-se citar diversos trabalhos concretizados, embora nenhum siga exatamente os mesmos protocolos aqui empregados. Como exemplo, no México 37 papagaios do gênero *Amazona* (*Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*) tanto confiscados como nascidos de cativeiro foram testados para influenza tipo A, paramixovírus tipo 1 (ambos pela inibição da hemaglutinação), culturas de suabes cloacais, entre outros exames. Os resultados foram negativos e o protocolo considerado como adequado para incluir os indivíduos no programa de reintrodução em uma área onde estavam extintos (PARÁS et al., 2002).

Rooney et al. (2001) examinaram 350 psitacídeos em reabilitação após serem confiscados na Guatemala e destinados à soltura. Em contraste ao padrão de exames realizados na maior parte das publicações, os autores se focaram mais na detecção de hemoparasitas e parasitas intestinais e na realização de hemograma considerando os protocolos empregados de fácil utilização, baixo custo e úteis para selecionar os indivíduos participando do projeto.

O Projeto Ara localizado na Costa Rica vêm fazendo reintroduções em locais de distribuição histórica e subsequentes reforços populacionais de Araras-piranga (*Ara macao*) há mais de dez anos e mais recentemente de Arara-verde-grande (*Ara ambigua*). Embora as aves empregadas no projeto sejam todas nascidas em cativeiro, as matrizes se originaram em grande parte de aves confiscadas. Dentre os protocolos empregados incluem-se suabes cloacais para influenza tipo A, paramixovírus tipo 1 e outros agentes testados pela PCR e que vêm provando ser um grande auxiliar para a seleção de indivíduos e manutenção de um *status* sanitário adequado tanto no criatório como nas aves a serem soltas; resultando em sucesso reprodutivo destes indivíduos no meio natural e um grande percentual de sobrevivência (em geral mais de 80%). Assim como o presente estudo, em todos estes anos de trabalho não se encontraram agentes com potencial infeccioso considerados de importância nas aves mantidas com boas práticas de manejo (ARA PROJECT, 2013).

Outros projetos de relocação com psitacídeos no Brasil vêm empregando protocolos similares aos utilizados neste estudo (PCR de suabes cloacais e fezes), inclusive havendo a disponibilidade de teste em laboratórios comerciais, embora não haja padronização do que geralmente é requerido em cada estado.

Os exames da IN-179/2008 se fundamentaram nos agentes mais comumente descritos na medicina de aves de estimação (GERLACH, 1994 a, b) e, portanto, foram utilizados como base para avaliar os indivíduos candidatos a programas de relocação.

A lista exata de todos os exames tal como descritos pela IN 179/2008 para aves inclui exames coproparasitológicos, hemograma completo e bioquímica sérica,

esfregaço de fezes corado pelo método de Gram, pesquisa de hemoparasitas, coleta de ectoparasitas, suabes para o isolamento de *Salmonella* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp.; além de isolamento para *Chlamydophila* sp., *Mycoplasma* spp., vírus da Doença de Newcastle e influenza. Também se descrevem exames sorológicos para a Doença de Newcastle, Doença de Pacheco, *Chlamydophila* sp. e *Mycoplasma* spp.; e PCR para *Chlamydophila* sp., *Mycoplasma* spp. e influenza aviária.

Nesta lista, se realizada exatamente como descrita, não somente se teria custos extremamente altos para a execução de exames individuais, como também seria impraticável do ponto de vista de centros de resgate que necessitam de resultados em pouco tempo devido às dificuldades em formar os lotes de aves para soltura (seja em decorrência de problemas associados à superlotação, a qual pode resultar em disseminação de doenças, e/ou devido à perda da capacidade etológica e física das aves para participar do programa de soltura), combinado ao planejamento de coletas e recebimento dos laudos em tempo para solicitação de documentação junto às autoridades ambientais.

A requisição de isolamento de alguns agentes não leva em consideração o tempo para execução e a não existência de exames padronizados para algum agente e validado para uso em aves silvestres. Além de que necessitam-se laboratórios que tenham o nível de biossegurança requerida sem contar a dificuldade inicial que é a de conservar e enviar amostras. Na maioria dos estados brasileiros não se possui infraestrutura para executar esses exames, tendo-se que recorrer ao envio de amostras por longa distância até um local que possua um laboratório adequado.

No presente estudo não se optou por incluir agentes comumente testados em psitacídeos, tais como *Chlamydophila psittaci*, herpesvírus de psitacídeos tipo 1, poliomavírus por não se contar com a facilidade no início da pesquisa para obter controles positivos além de se ter um número considerável de agentes para serem testados para cada amostra. Contudo, nos dois projetos a maioria das aves foram testadas em forma de *pool* de amostras pela PCR para estes agentes. Em duas aves

testadas individualmente e que resultaram positivas para *C.psittaci*, realizou-se tratamento sendo retestadas e resultando negativas.

Por outro lado agentes como o coronavírus, poxvírus e EPEC não constantes na instrução normativa foram testados no presente estudo tanto por interesse científico, como por serem considerados de importância (em maior ou menor grau) na clínica de aves e não haver informações científicas em quantidade a respeito, especialmente em aves confiscadas que irão ser soltas. O fato de não existir dados a respeito sobre doenças “desconhecidas” é muito utilizado como pretexto para a não aprovação de projetos que irão liberar animais selvagens.

Outros agentes também testados e não incluídos na metodologia por não fazerem parte dos testes estabelecidos inicialmente no projeto incluem culturas fúngicas para *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., esfregaço de sangue periférico para hemoparasitas, esfregaço de fezes corado pelo Gram, e exames coproparasitológicos. No caso da Fundação Lymington se obteve resultados positivos para *Candida* spp. em suabes de cavidade oral nas primeiras coletas, porém não havia nenhuma manifestação de sintomas e fazendo-se uso de observação diária cuidadosa optou-se por não fazer uso de antifúngicos. Resultados em aves assintomáticas de vida-livre também já foram relatados (SAIDENBERG et al., 2012 b).

É possível que a realização de exames envolvendo técnicas que indicassem a exposição prévia ao agente tais como diagnósticos sorológicos diversos citados na IN-179/2008 e outros não requeridos possam ser um complemento e auxílio para detectar aves que tiveram contato com os agentes pesquisados e, portanto, assessorar na decisão de se avaliar a ave no programa de soltura. Contudo alguns fatores prejudicam essa opção: a não existência de diversos exames comercialmente disponíveis com facilidade e a necessidade prévia de validação da metodologia para outras aves que não sejam de produção.

Os resultados negativos para os agentes testados no decorrer deste estudo, demonstram uma baixa prevalência ou no mínimo uma eliminação intermitente não

detectada com os métodos empregados. Esse último fato não parece provável, devido à variedade de idades, condições de manejo e diferenças de tempo entre coletas, o que teoricamente ajudaria a identificar alguns indivíduos que estivessem eliminando estes agentes em grupos tão heterogêneos.

Outra possibilidade também relacionada seria que o não achado dos agentes pesquisados estaria relacionado à já mencionada hipótese de viés de seleção como no caso de *Salmonella* spp., pois somente aves com potencial para serem reabilitadas e soltas foram testadas. Estes indivíduos poderiam ser considerados como os sobreviventes entre os sobreviventes dentre os grupos confiscados, sendo possivelmente geneticamente mais resistentes.

## **7.2 Discussão dos riscos de relocações**

Existe uma ampla disponibilidade de trabalhos revisando e discutindo a avaliação de riscos de doenças envolvidos em programas de relocação de animais selvagens (BALLOU, 1993; VIGGERS et al., 1993; KARESH, 1995; KOCK et al., 2007; KOCK et al., 2010), e inclusive em alguns casos se focando como fator principal para a não realização dos mesmos, em especial quando se trata de animais confiscados (SNYDER et al., 1994; SNYDER et al., 2000; JIMENES; CADEIA, 2004; BRIGHTMITH et al., 2005).

Nas instituições que trabalharam em conjunto com este projeto e em trabalhos paralelos com CETAS de diversos estados, se comprovou que os funcionários encarregados sempre comentaram não só as dificuldades financeiras e burocráticas envolvidas para se obter a liberação das aves de volta à natureza, mas principalmente um preconceito por parte de colegas que se opõem a este tipo de iniciativa por ainda considerarem ser “de alto risco”. E de importância significativa é a que os trabalhos já publicados no tema, seja no exterior ou no Brasil, não são difundidos e conhecidos no



meio científico e/ou daqueles que trabalham diretamente com animais confiscados/conservação de espécies no Brasil.

Na reintrodução feita com a espécie *Rhynchopsitta pachyrhyncha* nos EUA, um dos motivos inferidos pelos autores para o possível insucesso no estabelecimento de uma população foi o risco de exposição a doenças das aves com histórico de tráfico. O projeto foi afetado pela predação por aves de rapina presentes em grande número nos locais de liberação, e em uma ave que foi predada e recolhida para necropsia detectou-se *Pasteurella* spp. em suabe de coana. Os autores indicaram esse agente como a provável causa para facilitar a predação, rejeitando por completo futuras solturas de psitacídeos com este histórico (SNYDER et al., 1994). Contudo, estudos posteriores mostraram que a causa de doença não havia sido relacionada com o óbito pelos médicos veterinários do projeto, sendo um provável achado (GILARDI, 2013).

A possibilidade de se comparar resultados em amostragens seriadas nas instituições do presente projeto demonstrou ser importante para permitir a realização de uma avaliação mais segura quanto à sanidade dos animais envolvidos, sendo uma medida de grande utilidade para determinar uma seleção das aves e envio das mesmas aos programas de soltura. Igualmente significativo foi não haver relatos de manifestação de doenças nas aves nos locais de soltura seja imediatamente após ou no monitoramento a longo prazo.

A baixa frequência de amostras positivas para os agentes considerados de importância, e que poderiam inviabilizar a liberação de determinado indivíduo, parece demonstrar que existe um demasiado exagero na afirmação de que doenças representam um risco extremo impedindo projetos de relocação. Em realidade, a verdadeira definição deveria ser a de microrganismos com potencial para serem patogênicos de acordo com a situação ambiental e do hospedeiro, já que todos os ambientes possuem microrganismos que podem potencialmente causar doença. Isso é particularmente verdadeiro quando a concentração destes no ambiente é elevada facilitando a sua transmissão e/ou quando as práticas de manejo envolvidas são inadequadas. Conseqüentemente doenças podem ser em grande parte prevenidas,

minimizando-se a sua disseminação através de boas práticas de higiene e prevenção (PHALEN, 2006).

Nas instituições amostradas a análise e modificações do manejo demonstraram ser essenciais para a reabilitação, avaliação sanitária, formação de grupos e tomada de decisão na inclusão destes indivíduos nos programas de soltura.

Um fator de risco que não é considerado por parte de diversos autores/pesquisadores é justamente o risco da inação frente às dificuldades existentes na conservação de espécies na atualidade. Esta característica parece ser infelizmente a mais difundida no Brasil, fato que contrasta com a existente no exterior, não necessariamente em países ditos “desenvolvidos” e que, portanto, teriam maior disponibilidade de tecnologia para diagnósticos e recursos financeiros para bancar projetos deste tipo. A necessidade de agir antes que espécies desaparecessem por completo, mesmo se desconhecendo a metodologia ideal, riscos de patógenos, efeitos a longo prazo no meio ambiente, etc. levou a que espécies tão diversas como o Rinoceronte branco (*Ceratotherium simum*) e o Kakapo (*Strigops habroptilus*), entre muitos outros (OLMOS, 2012), pudessem ser salvas a tempo mesmo numa época em que o conhecimento científico sobre a medicina de animais selvagens estava em sua infância ou nem mesmo existia. Erros e acertos ocorreram e ocorrem em número mais do que suficiente para estabelecer as bases para essa “nova ciência” que realmente não é uma novidade (GRIFFITH et al., 1989; BALLOU, 1993; GRIFFITH et al., 1993; SEDDON et al., 2007; ARMSTRONG; SEDDON, 2008; SOORAE, 2011).

Atualmente a reintrodução de espécies, extintas em períodos anteriores à colonização europeia das Américas e Oceania, e até mesmo em tempos pré-históricos, vêm sendo discutida como maneira de se reestabelecer conexões perdidas que causaram um grande empobrecimento no ecossistema (DONLAN et al., 2005). Outros autores vão até mesmo além, ao levarem em consideração não apenas as extinções causadas diretamente por humanos, mas também os efeitos antropogênicos que vêm ocasionando as mudanças climáticas aceleradas em tempos atuais e que serão sentidas em todas as espécies, inclusive a nossa, em futuro próximo (THOMAS, 2011).

Deve-se reconhecer que não existe maneira realística de assegurar que animais relocados sejam totalmente considerados livres de patógenos potenciais, completamente removendo a possibilidade de ocorrência de doenças (BALLOU, 1993; PARÁS et al. 2002), já que nem mesmo na medicina humana existem exames 100% sensíveis e específicos.

A intolerância ou falta de objetividade em reconhecer a possibilidade de realização de projetos de relocação, apenas tem como consequência o atraso de importantes iniciativas levando-as ao “congelamento” ou mais frequentemente ao abandono, com resultados bem conhecidos de “conversação ao invés de conservação”. Portanto, torna-se imperativo avaliar cuidadosamente quais riscos são válidos de serem tomados como parte inerente de qualquer programa de conservação (BALLOU, 1993).

Outro fator desconsiderado por muitos que se opõem à realização de programas de relocação no Brasil são os riscos da importação, movimentação e venda de espécies de psitacídeos exóticos à fauna ou à região de ocorrência da espécie no país. Karesh et al. (2005) exemplificaram como os riscos de introdução de doenças de uma parte do mundo para outra devido ao comércio de animais selvagens (como animais de estimação e para outros propósitos de maneira legal ou não), são provavelmente muito mais significativos do que o risco calculado em projetos de conservação.

É bastante frequente o escape de aves que estavam sendo mantidas em cativeiro, seja em zoológicos, criatórios ou domicílios onde são mantidas como animais de estimação (legais ou não), ou até mesmo a soltura deliberada em alguns casos. Esses acontecimentos são frequentemente documentados sob forma de fotografias por grupos de observadores de aves e divulgados no meio eletrônico (WIKIAVES, 2013). Nestas situações o *status* sanitário dos indivíduos muitas vezes deixaria a desejar, em relação à segurança que representam na disseminação de possíveis patógenos no ambiente, quando comparados aos programas de relocação que seguem o mínimo dos padrões estabelecidos pela IN-179 ou outras legislações de cada país. É muito comum o estabelecimento de populações reprodutivas destes indivíduos de escape, principalmente em centros urbanos (CITY PARROTS, 2013). No caso de algumas

espécies como o Ringneck (*Psittacula krameri*) o potencial como espécie invasora é grande, tal como observado em muitos países da Europa e além de sua área de ocorrência natural na Ásia. Um agravante é o fato de serem comprovadamente portadores para algumas doenças de crescente importância tal como o Circovírus causador da Doença do Bico e das Penas, ainda considerado como patógeno exótico e pouco frequente em psitacídeos nativos da América do Sul. A transmissão deste vírus foi observada nas remotas Ilhas Maurício no Oceano Índico entre as aves invasoras originárias de escapes de cativeiro (*P.krameri*) e os criticamente ameaçados Periquitos-das-Ilhas-Maurício (*Psittacula echo*). Apesar de que a fonte de infecção original para os surtos da doença não fosse exclusivamente proveniente da espécie invasora, também sendo endêmica à espécie em estado portador, passando a manifestar sintomatologia provavelmente devido a pressões de fatores de estresse como a falta de alimentos, predação, além da endogamia devido ao gargalo genético (KUNDU et al., 2012).

Durante o projeto na Fundação Lymington até este momento é interessante notar que embora tenham ocorrido óbitos, estes foram relacionados a problemas não infecciosos. Uma ave em cativeiro apresentou morte súbita com bom escore corporal e à necropsia foi diagnosticado que veio a óbito por gota úrica visceral, provavelmente um resquício de uma alimentação desbalanceada durante seu desenvolvimento quando em cativeiro ilegal. Outro indivíduo que fora solto foi predado por um Gambá (*Didelphis aurita*) durante a noite. Estes dois casos mostram que embora tenham sido perdas significativas ao projeto, ainda assim não se observaram problemas de saúde nas aves soltas e nas restantes em cativeiro. Isso demonstra o auxílio dos exames sanitários no processo de seleção e manutenção dos indivíduos.

O fato de não se evidenciarem problemas infecciosos nas aves soltas é também muito significativo, pois a maioria dos autores afirma que aves confiscadas, em especial psitacídeos com histórico de muitos anos em cativeiro, são os piores candidatos para um projeto de relocação; seja pelo contato com doenças infecciosas diversas e por outros fatores como questões comportamentais (SNYDER et al., 1994, 2000; BRIGHTMITH et al., 2005).

Procedimentos de quarentena adequados e a realização de um mínimo de exames que analisem o *status* sanitário de animais que irão integrar um projeto de relocação minimizam de maneira significativa os riscos envolvidos, tal como também demonstrado em modelos experimentais de metapopulações manejadas (HESS, 1996), fato que foi observado no presente estudo tanto em cativeiro como no processo de liberação e posteriormente.

O risco de disseminação de doenças é frequentemente utilizado como justificativa para a não realização de programas de reabilitação e soltura. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a realização de exames que garantam a sanidade de animais que venham a ser candidatos a programas de relocação, é uma ferramenta importante para projetos que devem contar com embasamento científico.

### **7.3 Discussão dos custos envolvidos**

Para efeito de análise de custos envolvidos em programas de soltura, foram considerados valores cobrados (Junho de 2013) por uma instituição privada para realização dos mesmos exames (disponíveis comercialmente), e executados neste projeto: paramixovírus tipo 1 (R\$ 81,00), influenza tipo A (R\$ 213,00), poxvírus aviário (R\$ 64,00), coronavírus (R\$ 95,00) e *Salmonella* spp. (R\$ 65,00). Não são realizados exames para *Escherichia coli* Enteropatogênica. Desta forma, uma única ave representaria um custo mínimo de R\$ 518,00, já com desconto para médico veterinário e sem contar os custos de envio das amostras (cotação para Abril de 2013).

Para as instituições amostradas havia um limitado recurso anual destinado ao programa de soltura que não seria capaz de pagar por exames individuais.

Como exemplo da realidade atual, em um CETAS localizado no estado de São Paulo em que se coletou amostras para um projeto paralelo a este, não havia sequer

recursos para compra de isopor e gelo recicláveis ou possibilidade de envio de amostras por correio.

Não é apenas no Brasil que projetos direcionados à restauração de espécies e conservação do meio ambiente não recebem um apoio efetivo do governo, frequentemente dependendo de financiamento privado, principalmente internacional.

Contudo, o processo como um todo (e não somente em relação à execução de exames sanitários) não necessariamente deve ser sempre custoso e demorado como geralmente é a visão de quem procura iniciar neste tipo de empreendimento ou de quem quer justificar a impraticabilidade do mesmo. Um dos melhores exemplos de sucesso no Brasil envolve uma iniciativa leiga no local conhecido como Buraco das Araras (Jardim-MS), onde um proprietário de fazenda resolveu liberar por conta própria um casal de Araras-vermelhas-grandes (*Ara chloropterus*) que estava em cativeiro, em um local onde haviam sido extintas devido à ação humana. Embora não deva ser um exemplo a seguir no contexto dos cuidados sanitários, não obstante é um exemplo a ser seguido por outros projetos em que existem muitos gastos e pouco resultado. Houve não somente a perfeita adaptação dos indivíduos de volta ao meio selvagem, mas também a vinda de muitos outros indivíduos da espécie com o passar dos anos (somando-se mais de 100 indivíduos em 2009). E o fato mais surpreendente foi que a área se tornou um importante ponto turístico gerando verba para o proprietário que passou a ganhar mais com o ecoturismo do que com a atividade pecuária (LO; SAIDENBERG, 2010). Apesar de que essa iniciativa possa ser criticada sob os padrões de não se ter tomado em consideração cuidados para evitar a disseminação de doenças e outras análises de riscos, ainda assim é um exemplo do que pode ser atingido com poucos recursos bem direcionados.

Segundo a IN-179/2008, a lista de exames a serem feitos são uma recomendação para garantir um nível considerado adequado para diminuição de riscos, não uma obrigação legal, podendo-se justificar a não execução de determinado exame ao submeter-se o projeto para análise. Inclusive havia sido estabelecido que laboratórios governamentais fossem também responsáveis pela execução dos exames

para este tipo de iniciativa após cinco anos da data da publicação oficial (BRASIL, 2008 a), fato que não se concretizou até o momento.

A realização de todos os exames tal como requerido pela IN-179/2008 sem uma análise crítica de qual seria a necessidade tomando-se em conta a espécie, histórico de problemas de saúde e contactantes, frequência de determinado agente na família de aves e/ou no país, entre outros fatores a serem considerados pelo médico veterinário encarregado, leva apenas à execução de exames para preencher uma exigência burocrática e obter-se um laudo preferencialmente com resultados negativos que não gere maiores discussões. Esse fato foi observado, por exemplo, em relação ao Circovírus ainda que este não seja objeto de estudo dessa pesquisa. Este agente, embora importante, felizmente não é detectado com frequência em psitacídeos sul americanos e tampouco tem sido reportado como um problema em aves confiscadas no Brasil. Não obstante, para o projeto em Santa Catarina este exame foi requerido como essencial para permitir a liberação das aves, ainda que essas não apresentassem histórico de contato com esse agente e muito menos sinais clínicos.

Decisões deste tipo, repetidas entre os projetos existentes não apenas trazem maiores complicações na logística e estresse no manejo das aves, mas também adição de custos que poderiam ser utilizados com mais eficiência em outra parte do processo de relocação auxiliando um número maior de animais.

Uma opção que vêm sendo realizada em muitos projetos é a de testar amostras em *pool* para diminuir os custos, e caso haja positivos, procurar retestar para identificar os indivíduos. A baixa frequência de positividade para os agentes com potencial infeccioso pesquisados neste estudo, demonstra que os exames feitos em *pool* podem ser uma alternativa econômica caso o exame individual esteja fora de questão.

O exame sob forma de *pool* já é descrito como opção na IN 179/2008 para aves em lotes maiores de 101 indivíduos em que se fariam exames em 10% do grupo.

Tendo em vista que para obter um mínimo de segurança no projeto de relocação no Brasil depende-se quase exclusivamente da iniciativa privada, convênios com

universidades tornam-se não apenas uma necessidade, mas também uma oportunidade para troca em direção a um objetivo em comum. A dificuldade está justamente em manter estas iniciativas a longo prazo após os alunos envolvidos terem completado suas atividades no decorrer dos cursos de graduação ou pós.

Alternativas para baixar os custos e incrementar o sucesso devem ser procuradas de acordo com a análise e revisão de trabalhos que já foram realizados no país e no exterior e que estão disponíveis, apesar de ignorados por grande parte da comunidade científica. Um fator que pode sem dúvida contribuir para isso são as parcerias com pesquisadores e universidades, o que permite não só a diminuição dos gastos e logísticas envolvidas, mas também na geração de conhecimento científico e difusão do mesmo nos meios acadêmicos tal como realizado neste estudo.

#### **7.4 CONSEQUÊNCIAS DO PROJETO**

Diversas consequências indiretas, porém muito positivas puderam ser observadas de uma maneira aplicada, através de uma investigação similar ao processo conhecido como pesquisa-ação (TRIPP, 2005).

Nas instituições em que se trabalhou (incluindo-se outras em trabalho paralelo a este com diversas espécies), a possibilidade de realizar os exames e entregar resultados em tempo hábil contribuiu para que aves que estavam no local apenas esperando resultados de exames para serem liberadas pudessem finalmente ser encaminhadas à natureza.

Também um resultado da liberação das aves foi a criação de novos lugares para outras aves confiscadas, permitindo que ações de fiscalização e apreensão pudessem ser realizadas. Um fato que ocorre com frequência é que não havendo local para envio de aves apreendidas, em geral não se realizam operações deste tipo, ou pior, no caso de não haver local, em muitos estados o próprio governo tem permitido e inclusive



oficializado a posse dos animais ilegalmente mantidos ainda que estes possam ter condições de serem reabilitados e soltos (BRASIL, 2013).

Outra consequência sendo resultado da capacidade de selecionar indivíduos saudáveis para o projeto foi um grande sucesso na Fundação Lymington, com o estabelecimento de bandos de Papagaio-de-peito-roxo que percorrem a região agora totalmente independentes da alimentação suplementar, voltando raramente ao local dos viveiros de soltura. Mais um grande indicador de sucesso foi a utilização dos ninhos artificiais e postura realizada por um casal solto e também a utilização de um ninho natural em tronco de palmeira com três filhotes saindo do ninho e observados acompanhando os pais. A recolonização na área onde a espécie estava anteriormente extinta era o objetivo principal do projeto, sendo obtido em menos de um ano após a primeira soltura.

## 8 CONCLUSÕES

- A análise de amostras indica uma ausência para os agentes paramixovírus tipo 1, influenza tipo A, poxvírus aviário, coronavírus, *Escherichia coli* Enteropatogênica, e *Salmonella* spp., ao menos em psitacídeos que tenham sido pré-selecionados como candidatos para programas de relocação nas instituições amostradas.
- Não houve eliminação intermitente para os agentes nas amostragens seriadas.
- As amostragens permitiram selecionar e liberar as aves confiscadas diminuindo os riscos envolvidos.
- Psitacídeos confiscados podem ser candidatos para programas de relocação independente do seu histórico anterior, contanto que se tomem cuidados na seleção e manutenção até serem liberados.
- Os riscos envolvidos neste tipo de projeto existem, porém, em geral tendem a ser superestimados, contanto que se procure ter boas práticas de manejo que garantam um ambiente com razoável segurança sanitária e objetivando diminuir fatores de estresse.

- Os diversos exames tal como requeridos pela IN-179 só puderam ser realizados nestas instituições de forma individualizada devido ao convênio com este projeto.
- Devido à baixa frequência dos agentes pesquisados em psitacídeos, a amostragem sob forma de *pool* pode ser uma alternativa econômica para projetos deste tipo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A. A.; OSTFIELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C. A.; PEARL, M. C. **Conservation Medicine: Ecological health in Practice**. New York: Oxford University Press, 2002. 407 p.
- ALLGAYER, M. C. **Detecção de *Salmonella* spp. em psitacídeos de cativeiro através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 2003. 54 p. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2003.
- ALLGAYER, M. C.; OLIVEIRA, S. J.; MOTTIN, V. D.; LOIKO, M. R.; ABILLEIRA, F.; GUEDES, N. M. R.; PASSOS, D. T.; WEIMER, T. A. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Ciência Rural**, v. 39, p. 2542-2545, 2009.
- ANDA (AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DE DIREITOS ANIMAIS). **Centro de resgate recebe mil filhotes apreendidos do tráfico de animais**. [S.I.]: Agencia de Noticias de Direitos Animais, 2010. Disponível em: <<http://www.anda.jor.br/20/08/2009/cento-de-recuperacao-recebe-mil-filhotes-apreendidos-do-trafico-de-animais>>. Acesso: 17 out. 2010
- ARA PROJECT. **Macaw conservation in Costa Rica**. [S.I.]: The Ara Project, 2013. Disponível em: <<http://www.thearaproject.org>>. Acesso em 08 jun. 2013
- 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, p. 145-150, 2007.
- ARMSTRONG, D. P.; SEDDON P. J. Directions in reintroduction biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n.1, p. 20-25, 2008.
- BALLOU, J. Assessing the risks of infectious disease in captive breeding and reintroduction programs. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 327-335, 1993.
- BERRY, R. Reintroduction of Kaka (*Nestor meridionalis septentrionalis*) to Mount Bruce Reserve, Wairarapa. **Science for Conservation**, v. 89, p. 1173–2946, 1998.
- 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.
- BOOSINGER, T. R.; WINTERFIELD, R. W.; FELDMAN, D. S.; DHILLON, A. S. Psittacinepox virus: virus isolation and identification, transmission and cross-challenge studies in parrots and chickens. **Avian Diseases**, v. 26, p. 437-44, 1982.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **INSTRUÇÃO NORMATIVA No – 179**. Brasília: IBAMA, 2008. a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. IBAMA. **Revigoreamento e monitoramento do Papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea*, no Parque Estadual do Rio Turvo, SP**. São Paulo: IBAMA, 2008. b. Projeto preliminar.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. IBAMA. Soltura e Reprodução de *Amazona aestiva* em Tremedal-BA. In: ENCONTRO DE CETAS E ÁREAS DE SOLTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 3, 2010, São Paulo. 2010. p.28-31.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Guarda de animais silvestres, 2013. Disponível em: <[www.mma.gov.br/informma/item/9347-guarda-de-animais-silvestres](http://www.mma.gov.br/informma/item/9347-guarda-de-animais-silvestres)>. Acesso em: 26 mai. 2013

BRIGHTMITH, D.; HILBURN, J.; DEL CAMPO, A.; BOY, J.; FRISIUS, M.; FRISIUS, R.; JANIK, D.; GUILLEN, F. The use of hand-raised psittacines for reintroduction: a case study of Scarlet Macaws (*Ara macao*) in Peru and Costa Rica. **Biological Conservation**, v. 121, p. 465-472, 2005.

BRUNING-FANN, C.; KANEENE, J.; HEAMON J. Investigation of an outbreak of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet birds in Michigan, Indiana, Illinois, and Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p.1709-14. 1992.

BUTRON, O.; BRIGHTMITH, D. J. Testing for *Salmonella* spp. in released parrots, wild parrots, and domestic fowl in lowland Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, p. 718–723, 2010.

CARRARA, L. A.; FARIA, L. C. P.; MATOS, J. R., ANTAS, P. T. Z. Papagaio-de-peito-roxo *Amazona vinacea* (Kuhl) (Aves: *Psittacidae*) no norte do Espírito Santo: redescoberta e conservação. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 154-158, 2008.

CHU, D. K.; LEUNG, C. Y.; GILBERT, M.; JOYNER, P. H.; NG, E. M.; TSE, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S.; POON, L. L. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of Virology**, v. 85, p. 12815-12820, 2011.

CITY PARROTS. **Urban parrot conservation**. [S.l.]: City Parrots – Urban Parrot Conservation, 2013. Disponível em: <<http://www.cityparrots.org>>. Acesso em: 16 de abr. 2013

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

- COCKLE, K. L., BODRATI, A. **Vinaceous Parrot (*Amazona vinacea*), Neotropical Birds Online**. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology, 2011. Disponível em: <[http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/species/overview?p\\_p\\_spp=199736](http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/species/overview?p_p_spp=199736)> Acesso em 15/04/2011.
- COIMBRA-FILHO, A.; SILVA, R. R. Ensaio de repovoamento e reintroduções de três espécies regionais do gênero *Pyrrhura* no Parque Nacional da Tijuca, RJ, Brasil (*Psittacidae* - Aves). **Boletim da Fundação Brasileira para Conservação da Natureza**, v. 25, p. 11-25, 1998.
- COLLAR, N. J. Parrot reintroduction: towards a synthesis of best practice. In: INTERNATIONAL PARROT CONVENTION, 6., 2006, Puerto de la Cruz, Tenerife. **Anais...** Espanha: Loro Parque, 2006. p. 82-107.
- COLLAR, N. J.; GONZAGA, N. K.; RABBE, N. K.; MADRONO NIETO A.; NARANJO, C. G.; PARKER II, T. A.; WEGE, D.C. **Threatened birds of the Americas**. The ICBP/IUCN Red Data Book., 3ed., Reino Unido: Smithsonian Institution Press, International Council for Bird Preservation. 1992. 1150 p.
- CUNNINGHAM, A. A. Disease risks of wildlife translocations. **Conservation Biology**, v. 10, p. 349-353, 1996.
- DEEM, S. L., NOSS, A. J.; CUÉLLAR, R. L.; KARESH, W. B. Health evaluation of free-ranging and captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, p. 598-605, 2005.
- DONLAN, C. J.; BERGER, J.; BOCK, C. E.; BOCK, J. H.; BURNEY, D. A.; ESTES, J. K. A.; FOREMAN, D.; MARTIN, P. S.; ROEMER, G. W.; SMITH, F. A.; SOULE, M. E.; GREENE, H. W. Pleistocene Rewilding: An Optimistic Agenda for Twenty-First Century Conservation. **The American Naturalist**, v.168, 2006.
- 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, p. 951-962, 1985.
- ERICKSON, G. A.; MARÉ C. J.; GUSTAFSON, G. A.; MILLER L. D.; PROCTOR, S. J.; CARBREY, E. A. Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. I. Clinical and serologic responses, and viral excretion. **Avian Diseases**, v. 21, p. 642-654, 1977.
- ESCUTENAIRE, S.; MOHAMED, N.; ISAKSSON, M.; THORÉN, P.; KLINGEBORN, B.; BELÁK, S.; BERG, M.; BLOMBERG, J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Archives of Virology**, v. 152, p. 41-58, 2007.

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.

FERREYRA, H.; MARULL C.; UHART M.; BANCHS R.; MOSCHIONE, F. PEREDA, A. Salud de pichones silvestres de loro hablador (*Amazona aestiva*) en el chaco semiárido argentino. In: REUNIÓN ARGENTINA DE ORNITOLOGÍA, 12., San Martín de los Andes, Neuquén. **Anais...** Argentina: RAO, 2008.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE B. W.; HARRISON G. J.; HARRISON L. R. **Avian Medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994a, p.949-983.

GERLACH, H. Viruses. In: RITCHIE B.W.; HARRISON G.J.; HARRISON L.R. **Avian Medicine: Principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994b. p. 862-948.

GILARDI, J. D. **thick billed parrot releases**. [S.l.]: World Parrot Trust, 2013. Disponível em: <<http://www.parrots.org>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

GILARDI, K. V. K.; LOWENSTINE, L. J.; GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydophilial, and parasitic diseases in wild Dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and Tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, p. 523-528, 1995.

GLÜNDER, G. Influence of diet on the occurrence of some bacteria in the intestinal flora of wild and pet birds. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.109, p. 266-70, 2002.

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.

GONZALEZ-HEIN, G.; GONZALEZ, C.; HIDALGO, H. Case report: an avian pox outbreak in captive psittacine birds in Chile. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.17, p. 210–215, 2008.

GOUGH, R. E.; DRURY, S. E.; CULVER, F.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* - Cassin). **Avian Pathology**, v. 35, p. 122-126, 2006.

**GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE**. Statistical analysis systems for personal computers. S.I., 1990-1993.

GRESPLAN, A. **Relato de caso**. [S.l.]: Wildvet, 2007. Disponível em: <<http://www.wildvet.com.br/>>. Acesso em: 05 jun. 2009.

- GRIFFITH B.; SCOTT, J. M.; CARPENTER J. W.; READ, C. Translocation as a species conservation tool: status and strategy. **Science**, v. 245, p. 477-480, 1989.
- GRIFFITH, B.; SCOTT, J. M.; CARPENTER, J. W.; REED, C. Animal translocations and potential disease transmission. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 231-236, 1993.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAWKINS, M. G.; CROSSLEY, B. M.; OSOFSKY, A.; WEBBY, R. J.; LEE, C.-W.; SUAREZ, D. L.; HIETALA, S. K. H5N2 avian influenza A in a red-lored Amazon parrot (*Amazona autumnalis autumnalis*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 228, p. 236–241, 2006.
- HESS, G. Disease in metapopulation models: Implications for conservation. **Ecology**, v. 77, p. 1617-1632, 1996.
- HONKAVUORI, K. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; WILLIAMS, B. L.; QUAN, P. L.; HORNIG, M.; STREET, C.; PALACIOS, G.; HUTCHISON, S. K.; FRANCA, M.; EGHOLM, M.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1883–1886, 2008.
- IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Guidelines for the placement of confiscated animals, prepared by the IUCN/SSC re-introduction specialist group**. IUCN, Gland, Switzerland, ERWDA, Abu Dhabi, UAE. 24pp. 2002. Disponível em: [http://www.iucnsscrg.org/policy\\_guidelines.php](http://www.iucnsscrg.org/policy_guidelines.php). Acesso em: 17 set. 2009.
- JIMENES, I.; CADEIA, C. Por qué no liberar animales silvestres decomisados. **Ornitología Colombiana**, v. 1, p. 53-57, 2004.
- JUNIPER, T.; PARR, M. Systematics. Parrots. In: \_\_\_\_\_. **A guide to the parrots of the world**. Reino Unido: Pica Press, 1998. 584 p.
- KARESH, W. B. Wildlife rehabilitation: additional considerations for developing countries. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 26, p. 2-9, 1995.
- KARESH, W. B.; COOK, R. A.; BENNETT, E. L.; NEWCOMB, J. Wildlife trade and global disease emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1000-1002, 2005.
- KISTLER, A. L.; GANCZ, A.; CLUBB, S.; SKEWES-COX, P.; FISCHER, K.; SORBER, K.; CHIU, C. Y.; LUBLIN, A.; MECHANI, S.; FARNOUSHI, Y.; GRENINGER, A.; WEN, C. C.; KARLENE, S. B.; GANEM, D.; DERISI, J. L. Recovery of divergent avian Bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. **Virology Journal**, v. 5, p. 88, 2008.



KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A. B. S.; MORENA, A. M.; GOMES T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIA, A. J. P. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 916-921, 2011.

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, p. 1071-1073, 2002.

KOCK, R. A.; SOORAE, P. S.; MOHAMMED, O. B. Role of veterinarians in re-introductions. **International Zoo Yearbook**, v. 41, p. 24–37, 2007.

KOCK, R. A.; WOODFORD, M. H.; ROSSITER, P. B. Disease risks associated with the translocation of wildlife. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 29, p. 329-350, 2010.

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, p. 87-95, 2005.

KUNDU, S.; FAULKES, C. G.; GREENWOOD A. G.; JONES, C. G.; KAISER, P.; LYNE, O. D.; BLACK, S. A.; CHOWRIMOOTO, A.; GROOMBRIDGE, J. J. Tracking viral evolution during a disease outbreak: The rapid and complete selective sweep of a Circovirus in the endangered Echo parakeet. **Journal of Virology**, v. 86, p. 5221-5229, 2012.

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, p. 397-398, 2004.

LIMA, P. C.; SANTOS, S. S. Reprodução de uma população reintroduzida de *Aratinga auricapilla* (Kuhl, 1820) Aves: *Psittacidae*, em área de Cerrado no Leste da Bahia. **Ornithologia**, v.1, p.13-17. 2005.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

LO, V. K.; SAIDENBERG, A. B. S. Reintrodução de Araras vermelhas em Jardim-MS: o caso do Buraco das Araras. In: ENCONTRO DE CETAS E ÁREAS DE SOLTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 3., 2010, São Paulo. p.44. 2010.

LOPES, J. C. **O Tráfico de Animais Silvestres no Brasil**. [S.l.]: Artigos, 2000. Disponível em: <<http://www.IBAMA.gov.br/online/artigos/artigo18.html>>. Acesso em 03 abr. 2010

- MACDONALD, S. E.; LOWENSTINE, L. J.; ARDANS, A. A. Avian pox in Blue-fronted Amazon parrots. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, p. 1218-22, 1981.
- MAGALHÃES, R. W. Papagaio-de-peito-roxo. **Iniciativas para Preservação de Psitacídeos**. São Paulo: Eco Associação para Estudos do Ambiente. p. 10-33. 2006.
- MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; DE ALMEIDA, S. M.; DE LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L. Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in the intestinal microbiota of *Psittaciformes* in rehabilitation process for wildlife reintroduction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 185-189, 2010. a.
- MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; DE ALMEIDA, S. M.; DE LIMA, E. T.; OKAMOTO, A. S.; PINCZOWSKI, P.; ANDREATTI FILHO, R. L. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Blue-Fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*). **Avian Diseases**, v. 54, p. 151-155. 2010. b.
- MASE, M.; IMADA, T.; SANADA, Y.; ETOH, M.; SANADA, N.; TSUKAMOTO, K.; KAWAOKA, Y.; YAMAGUCHI, S. Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. **Journal of Virology**, v. 75, p. 3490-3494, 2001.
- MATTES, B. R.; CONSIGLIO, S. A. S.; ALMEIDA, B. Z. de; GUIDO, M. C.; ORSI, R. B.; SILVA, R. M. da ; COSTA, A.; FERREIA, A. J. P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 13-16, 2005.
- MUNSON, L.; COOK, R. A. Monitoring, investigation, and surveillance of diseases in captive wildlife. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 281-290, 1993.
- MURADRASOLI, S.; BÁLINT, A.; WAHLGREN, J.; WALDENSTRÖM, J.; BELÁK, S.; BLOMBERG, J.; OLSEN, B. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering strait area (Beringia). **PLoS One**, v. 5, n. 10, 2010.
- OLMOS, F. Soltura de animais silvestres: menos conversa e mais ação. **Relatório de Atividades dos Centros de Triagem e Áreas de Soltura e Monitoramento de Animais Silvestres**. Núcleo de Fauna e Recursos Pesqueiros do IBAMA/SP – São Paulo, 2012. p. 13-14.
- OROSZ, S. E.; CHENGAPPA, M. M.; OYSTER, R. A.; MORRIS, P. J.; TROCK, S.; ALTEKRUSE, S. *Salmonella enteritidis* infection in two species of *Psittaciformes*. **Avian Diseases**, v. 36, p. 766-769, 1992.
- PANIGRAPHY, B.; SENNE, D. A.; PEARSON, J. E.; MIXSON, M. A.; CASSIDY, D. R. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. **Avian Diseases**, v. 37, p. 254-258, 1993.

PARÁS, A.; MACÍAS, C.; CIEMBOR, P.; STONE, E.; LAMBERSKI, N.; RITCHIE, B. Pre-release health evaluation of Amazona parrots in Northeast Mexico. **Proceedings of the Association of Avian Veterinarians**, p. 365-367, 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, p. 46-55, 2006.

PHALEN, D. N. Preventive Medicine and Screening. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. Florida: Spix, 2006. p. 573-585.

PILLAI, S. P. S.; SUAREZ, D. L.; PANTIN-JACKWOOD, M.; LEE, C.-W. Pathogenicity and transmission studies of H5N2 parrot avian influenza virus of Mexican lineage in different poultry species. **Veterinary Microbiology**, v.129, p. 48-57, 2008.

PODDAR, S. K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. **Journal of Virological Methods**, v. 99, p. 63-70, 2002.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C., CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probe**, v. 6, p. 271-279, 1992.

RENTAS (REDE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES). **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre**. [S.I.]: RENTAS, 2001. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br>>. Acesso em: 12 out. 2010

RIGBY, C. E.; PETTIT, J. R.; PAPP-VID, G.; SPENCER, J. L.; WILLIS, N. G. The isolation of *salmonellae*, Newcastle disease virus and other infectious agents from quarantined imported birds in Canada. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.45, p.366-70, 1981.

RITCHIE, B. W.; CARTER, K. *Poxviridae*. In:\_\_\_\_\_. **Avian viruses function and control**. Lake Worth: Wingers, 1995. p. 285-311.

RIVA, H. G.; CARDOSO, T. C.; TEIXEIRA, M. C. B.; GOMES, D. E.; JEREZ, A. J. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. In: CONGRESSO, 13.; XIX ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 2010, 14; Campos do Jordão. 2010. **Anais...** 2010. Campos do Jordão: [s. n.], p. 125-128

ROONEY, M. B.; BURKHARD, M. J.; GREINER, E.; ZENG, Q.-Y.; JOHNSON. J. Intestinal and blood parasites in Amazon parrots destined for relocation in Guatemala. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 32, p. 71-73, 2001.

SAIDENBERG, A. B. S.; VILLAREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; GUIMARÃES, M. B. Detecção de poxvírus aviário em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) pela reação

em cadeia pela polimerase (PCR). In: CONGRESSO DA SZB, 31; CONGRESSO DA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PARQUES E ZOOLOGICOS E ACUÁRIOS, 14; XVI ENCONTRO DA ABRAVAS, 16; 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Abravas, SZB, ALPZA, 2007.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas.** 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAIDENBERG, A. B. S.; GUEDES, N. M. R.; SEIXAS, G. H. F.; ALLGAYER, M. C.; DE ASSIS, E. C. P.; SILVEIRA, L. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. A Survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **ISRN Veterinary Science**, p. 1-6, 2012 a.

SAIDENBERG, A. B. S.; DE ASSIS, E. C. P.; MELVILLE, P. A.; SILVEIRA, L. F.; ZUNIGA, E. ; SALABERRY, S. R.; BRACONARO, P.; BENITES, N. R. Avaliação do status sanitário de filhotes de Arara-de-Lear (*Anodorhynchus leari*) em vida-livre. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia, 21; 2012, Santos. **Anais...** Santos.: CLAM, 2012. b. v. 428-1

SAIDENBERG, A. B. S.; TEIXEIRA, R. H. F.; GUEDES, N. M. R.; DA COSTA ALLGAYER, M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 922, 2012. c.

SANZ, V.; GRAJAL, A. Successful reintroduction of captive-raised Yellow-shouldered Amazon parrots on Margarita Island, Venezuela. **Conservation Biology**, v. 12, p. 430-441, 1998.

SAREYYUPOGLU, B.; OK, A. C.; CANTEKIN, Z.; YARDIMCI, H.; AKAN, M.; AKCCAY, A. Polymerase chain reaction detection of *Salmonella* spp. in fecal samples of pet birds. **Avian Diseases**, v. 52, p.163–167, 2008.

SEAL, B. S.; KING, D. J.; LOCKE, D. P.; SENNE, D. A.; JACKWOOD, M. W. Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1141-5. 1998.

SEDDON, P. J.; ARMSTRONG, D.P.; MALONEY, R. F. Developing the Science of Reintroduction Biology. **Conservation Biology**, v. 21, p. 303–312, 2007.

SEIXAS, G. H. F.; MOURÃO, G. M. Assessment of restocking Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Brazil. **Ararajuba**, v. 8, p. 73-78, 2000.

- SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. In: \_\_\_\_\_. **Parrots - status survey and conservation action plan 2000–2004**. Gland, Suíça; Cambridge, Reino Unido: IUCN; The World Parrot Trust, 2000. p. 98-151.
- SNYDER, N. F. R.; KOENIG, S. E.; KOSCHMANN, J.; SNYDER, H. A.; JOHNSON, T. B. Thick-billed parrot releases in Arizona. **Condor**, v. 96, p. 845-862, 1994.
- SPALDING, M. G.; FORRESTER, D. J. Disease monitoring of free ranging and released wildlife. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 271-280, 1993.
- SOORAE, P. S. **Global Re-Introduction Perspectives: 2011. More case studies from around the globe**. Gland, Suíça: IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group e Abu Dhabi, EAU: Environment Agency-Abu Dhabi. 2011. 250 p.
- STANFORD, M. Effects of dietary change on fecal Gram's stains in the African grey parrot. **Exotic DVM**, v. 4, p. 12–13, 2003.
- STONE, E. G.; MONTIEL-PARRA, G.; PÉREZ, T. M. A survey of selected parasitic and viral pathogens in four species of Mexican parrots, *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, and *Rhynchopsitta pachyrhyncha*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, p. 245-249, 2005.
- TABOR, G. M. In: SOULÉ, M. E.; ORIAN, G. H. **Conservation Biology: Research Priorities for the Next Decade**. Washington: Island Press, 2001. p. 155-173.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- THOMAS, C. D. Translocation of species, climate change, and the end of trying to recreate past ecological communities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, p.216-221, 2011.
- THOMAZELLI, L. M.; ARAUJO, J. DE.; FERREIRA, C. DE S.; FURTADO, R.; OLIVEIRA, D. B.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILHIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M. L.; DURIGON, E. L. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the North Eastern Coast and Amazon biome of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, p. 01-07, 2012.
- TIKASINGHJ, E. S.; WORTH C. B.; SPENCE L.; AITKEN, T. H. G. Avian pox in birds from Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 18, p. 133-139, 1982.
- TIWARI, A. K.; KATARIA, R. S.; NANTHAKUMAR, T.; DASH, B. B.; DESAI, G. Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 163-169, 2004.

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

TRIPP, D. **Educação e Pesquisa**, v. 31, p. 443-466, 2005.

VALLE, A.; CHAGAS, N. Reintrodução de araras na Chapada Imperial - DF: Condicionamento de vôo, preferência alimentar e percepções de ecoturismo. In: ENCONTRO DE CETAS E ÁREAS DE SOLTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 3; 2010, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Encontro de CETAS, 2010. p. 51-54.

VIÉ, J. C.; HILTON-TAYLOR, C.; STUART, S. N. **Wildlife in a changing world – An analysis of the 2008 IUCN red list of threatened species**. Gland, Suíça: IUCN. 2009.

VIGGERS, K. L.; LINDENMAYER, D. B.; SPRATT, D. M. The importance of disease in reintroduction programmes. **Wildlife Research**, v. 20, p. 678-698, 1993.

VILELA, V. O.; GUEDES, N. M. R.; ARAÚJO, F. R.; SOLARI, C. A.; FILIÚ, W. F. O.; CATELARI, V. L.; ALVES, M. M.; DE CARMO, M. A.; DE SOUZA, R. A.; VARGAS, F. C. **Salmonella Bredney in hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA, 9; ENCONTRO NACIONAL DE ANILHADORES DE AVES, 8; ENCONTRO DE ORNITOLOGIA DO MERCOSUL, 2., 2001, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2001. R224.

WEBB, J. Prosecuting wildlife traffickers: important cases, many tools, good results. **Vermont Journal of Environmental Law**. v. 2, 2000-2001. Disponível em: [www.vjel.org/journal/vjel10006.html](http://www.vjel.org/journal/vjel10006.html). Acesso em: 26 jun. 2013

WEGE, D. C.; LONG, A. J. Key areas for threatened birds in the Neotropics. **BirdLife International**. Cambridge, Reino Unido: Birdlife Conservation Series n. 5. 1995.

WIKIAVES. **Registros de aves**. [S.l.]: A enciclopédia das aves do Brasil. Disponível em: <http://www.wikiaves.com.br>. Acesso em: 16 abr. 2013

## APÊNDICE A

**Quadro 1. Sequencias e fragmentos esperados dos *primers* utilizados**

Agente	Sequencia	Amplicon	Referência	Gene
EPEC	S - CTGAACGGCGATTACGCGAA	917bp	Aranda et al., 2007	<i>eae</i>
EPEC	AS - CGAGACGATACGATCCAG			
EPEC	S - AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326bp	Aranda et al., 2007	<i>bfp</i>
EPEC	AS - GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>Salmonella</i> spp.	S - TTGTTACGGCTATTTTGACCA	521bp	Rahn et al., 1992	<i>invA</i>
<i>Salmonella</i> spp.	AS - CTGACTGCTACCTTGCTGATG			
Paramixovírus tipo 1	S - TTGATGGCAGGCCTCTTGC	255 bp	Tiwari et al., 2004	Proteína de fusão
Paramixovírus tipo 1	AS - AGCGTYTTCTGTCTCCT			
Influenza tipo A	S - CCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGAT	311 bp	Poddar et al., 2002	Matriz
Influenza tipo A	AS - GGCAAGTGCACCAGCAGAATAACT			
Coronavírus	S - TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA	179 bp	Escutenaire et al., 2007	<i>1b</i>
Coronavírus	AS - GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC			
Poxvírus	S - CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578 bp	Lueschow et al., 2004	<i>4b</i>
Poxvírus	AS - CGGTAGCTTAACGCCGAATA			

**Quadro 2. Resultados positivos para *Escherichia coli* nas culturas dentre as amostragens seriadas. A soma das amostras indica tanto suabes de cloaca como fezes após a liberação de acordo com a fase de cada projeto**

(Continua)

	Fund. Lymington	R3 ANIMAL
<i>E.coli</i> positivas na 1º amostragem/número de amostras (suabes de cloaca)	08/29	10/13
<i>E.coli</i> positivas na 2º amostragem/número de amostras (suabes de cloaca)	07/29	01/13
<i>E.coli</i> positivas na 3º amostragem/número de amostras (amostras de fezes para R3 Animal)	02/29	00/15
<i>E.coli</i> positivas na 4º amostragem/número de amostras ( <i>pool</i> de amostras de fezes)	05/18	-



(conclusão)

<b><i>E.coli</i> positivas na 5ª amostragem/número de amostras (08 amostras de suabes e as restantes <i>pool</i> de fezes)</b>	02/16	-
<b><i>E.coli</i> positivas na 6ª amostragem/número de amostras (08 amostras de suabes e as restantes <i>pool</i> de fezes)</b>	00/14	-
<b><i>E.coli</i> positivas na 7ª amostragem/número de amostras (<i>pool</i> de amostras de fezes)</b>	00/09	-
<b><i>E.coli</i> positivas na 8ª amostragem/número de amostras (<i>pool</i> de amostras de fezes)</b>	01/07	-
<b>Total</b>	<b>25/151</b>	<b>11/41</b>

**Quadro 3. Resultados positivos em cada indivíduo para *Escherichia coli* amostrado por suabes cloacais na ONG R3 Animal quando em cativeiro, segundo o número de coletas**

**(Continua)**

		Coletas seriadas		Resultado
Ave	Status	1	2	
R01	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R02	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R03	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R04	solto	*	*	Positivo na primeira coleta e segunda coleta
R05	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R06	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R07	solto	*	*	Positivo na primeira coleta

**(Conclusão)**

R08	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R09	solto	*	*	-
R10	solto	*	*	-
R11	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R12	solto	*	*	Positivo na primeira coleta
R13	solto	*	*	-

**Quadro 4. Resultados positivos para *Escherichia coli* em cada indivíduo amostrado por suabes cloacais quando em cativeiro na Fundação Lymington, segundo o número de coletas**

**(Continua)**

		Coletas seriadas					Resultado
Ave	Status	1	2	3	4	5	
L01	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira e segunda coleta
L02	solto	*	*	*	-	-	-
L03	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira e segunda coleta
L04	solto	*	*	*	-	-	-
L05	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira e segunda coleta
L06	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira e segunda coleta
L07	solto	*	*	*	-	-	-
L08	solto	*	*	*	-	-	-

(Continua)

L09	solto	*	*	*	-	-	-
L10	solto	*	*	*	-	-	-
L11	solto	*	*	*	-	-	-
L12	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira coleta
L13	solto	*	*	*	-	-	-
L14	solto	*	*	*	-	-	-
L15	solto	*	*	*	-	-	-
L16	solto	*	*	*	-	-	-
L17	solto	*	*	*	-	-	-
L18	solto	*	*	*	-	-	-

**(Conclusão)**

L19	solto	*	*	*	-	-	Positivo na primeira, segunda e terceira coleta
L20	solto	*	*	*	-	-	-
L21	solto	*	*	*	-	-	-
L22	cativeiro	*	*	*	*	*	Positivo na primeira e segunda coleta
L23	cativeiro	*	*	*	*	*	-
L24	cativeiro	*	*	*	*	*	-
L25	cativeiro	*	*	*	*	*	Positivo na primeira, segunda e terceira coleta
L26	cativeiro	*	*	*	*	*	-
L27	cativeiro	*	*	*	*	*	-
L28	cativeiro	*	*	*	*	*	-
L29	cativeiro	*	*	*	*	*	-