

## Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos<sup>1</sup>

Isadora M. de O. Corrêa<sup>2</sup>, Fernanda Flores<sup>2</sup>, Gustavo H. Schneiders<sup>2</sup>,  
Larissa Q. Pereira<sup>2</sup>, Benito G. Brito<sup>3</sup> e Maristela Lovato<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- Corrêa I.M.O, Flores F, Schneiders G.H., Pereira L.Q., Brito B.G. & Lovato M. 2013. [Detection of virulence factors in *Escherichia coli* and analysis of *Salmonella* spp. in psittacines.] Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(2):241-246. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [maristelalovato@gmail.com](mailto:maristelalovato@gmail.com)

The enteric flora of psittacines is mainly composed of Gram positive bacteria. Gram negative bacteria, like *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., have a high pathogenic potential and can be considered as an indicative of management problems that may culminate in disease manifestation due to stress factors, poor diets and overcrowding, in combination with a high bacterial load on the environment. The objective of this study was evaluated the presence of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and the virulence genes *iss* and *iutA* from *E. coli* isolates. Forty-four samples were analyzed from psittacines living in captivity, which fifteen samples were from organs fragments of necropsied birds, and twenty-nine were from cloacal and crop swabs of red-spectacled parrots (*Amazona pretrei*) keeping in captivity. No samples were positive for *Salmonella* spp. In the samples in which *E. coli* was detected, both virulence factors (genes *iss* and *iutA*) were present.

INDEX TERMS: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., genes *iss*, *iutA*, *Amazona pretrei*, PCR, psittacines.

**RESUMO.**- A flora entérica dos psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram positivas. Bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., apresentam elevado potencial patogênico, sendo consideradas indicativo de problemas de manejo, que poderão culminar em manifestação de doenças em decorrência de fatores estressantes, dietas deficientes e superlotação, combinados com alta carga bacteriana no ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e os fatores de virulência dos genes *iss* e *iutA* dos isolados de *E. coli*. Analisou-se um total de 44 amostras provenientes de psitacídeos criados em cativeiro, sendo estas 15 fragmentos de órgãos de aves submetidas a exame de necropsia e também 29 amostras de swabs de cloaca e ingluvío de papagaios-charão (*Amazona pretrei*)

criados em cativeiro. Nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp. Nas amostras de *E. coli* detectou-se ambos os fatores de virulência pesquisados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., genes *iss*, *iutA*, *Amazona pretrei*, PCR, psitacídeos.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior número de espécies de aves da família Psittacidae, pois das 344 espécies existentes no mundo, 72 são brasileiras, sendo esse grupo aviário um dos principais alvos do comércio ilegal da fauna silvestre (Sigrist 2006). As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. (Gast 2003), e o sorovar S. Typhimurium é o mais isolado em aves de estimação (Menão et al. 2000). Este sorovar também foi isolado de surto de salmonelose, com taxa de mortalidade atingindo 22%, em psitacídeos mantidos em zoológico e a fonte de contaminação foi atribuída ao contato com répteis, tais como serpentes, e a contaminação do solo (Ward et al. 2003).

Outros sorotipos podem ser associados ao quadro de salmonelose em aves silvestres, tais como *Salmonella* Enteritidis que foi isolada de psitacídeos, sendo dois filhotes

<sup>1</sup> Recebido em 24 de fevereiro de 2012.

Aceito para publicação em 6 de setembro de 2012.

<sup>2</sup> Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000. Prédio 44, sala 5152, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [maristelalovato@gmail.com](mailto:maristelalovato@gmail.com)

<sup>3</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Estrada Municipal do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS 92990-000, Brasil.

com sinais clínicos variados cursando com infecções virais e parasitárias concomitantes, e uma ave adulta que foi considerada assintomática (Orosz et al. 1992). A adoção de medidas de biossegurança, por exemplo, a necessidade de recinto para quarentenário, é demonstrada no relato de infecção seguida de morte em uma cacatua por *Salmonella Arizonae*, relacionada ao alojamento com répteis (Orós et al. 1998).

A prevalência de sorovares de *Salmonella* de origem aviária foi avaliada no período de três décadas (1962-1991) identificando como os sorovares mais frequentes Gallinarum, Pullorum e Typhimurium, mas as amostras de aves e pássaros silvestres corresponderam somente a 0,47% do total das cepas analisadas (Hofer et al. 1997). As salmonelas são encontradas em todas as partes do mundo, infectam e são transportadas por uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo humanos, animais silvestres e domésticos. Informações sobre a ocorrência e distribuição dos sorovares na população de animais silvestres e domésticos são essenciais para relacionar os reservatórios responsáveis pela sua transmissão (Gast 2003).

Na grande maioria das espécies aviárias *Escherichia coli* é descrita como um patógeno mais frequentemente isolado que *Salmonella* spp., sendo a enterobactéria mais descrita no mundo (Gerlach 2004). Durante o processo evolutivo algumas cepas de *E. coli* adquiriram diferentes conjuntos de genes que lhe conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina a grande versatilidade patogênica dessa espécie (Hirsh 2004).

A microbiota intestinal de psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram positivas, não sendo considerada saudável a presença de bactérias Gram negativas (Bangert et al. 1988, Flammer & Drewes 1988, Harrison & McDonald 1996). Segundo Marietto-Gonçalves et al. (2010), o monitoramento para a presença de bactérias Gram negativas da microbiota entérica de psitacíformes deve ser incluído na rotina de criação destas aves, pois não pertencem à flora fisiológica havendo risco de disseminação de possíveis patógenos para o homem e outros animais.

O conceito de patogenicidade em amostras de *E. coli* está relacionado com o impacto de um ou vários fatores de virulência que servem para diferenciar amostras patogênicas de não patogênicas (Johnson 1991). Muitos genes que codificam estes fatores são encontrados em plasmídeos conjugativos, por causa da ocorrência de resistência bacteriana nestes mesmos plasmídeos é possível que o uso de agentes antimicrobianos possa selecionar a persistência de *E. coli* que os contêm (Johnson 2004). Algumas cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC – “Avian Pathogenic *E. coli*”) apresentam aumento de resistência aos efeitos líticos do soro (“increased serum survival” - *iss*) sendo esta característica determinada por gene plasmídeo (Ewers et al. 2007).

*E. coli* também expressa alta afinidade por sistemas de captação de ferro que são compostos sideróforos da aerobactina (genes *iuc*) e seus receptores de membrana externa (gene *iutA*) (Vidotto et al. 1994, Chouikha et al. 2008). Delicato et al. (2003) sugeriram que a associação entre *iut* e *iss* pode aumentar o potencial de virulência de APEC. Yaguchi

et al. (2007) descreveram que *iss* e *iutA* estavam amplamente distribuídos em APEC e diferiram significativamente dos índices de positivos em isolados de *E. coli* comensais.

Os psitacídeos utilizados neste estudo eram em sua maioria papagaios-charão (*Amazona pretrei*) mantidos em cativeiro, espécie classificada como vulnerável pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Também se encontram na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção (MMA/IBAMA), fato este que torna os resultados obtidos essenciais para a adoção de medidas profiláticas que visem assegurar a preservação desta espécie, ao melhorar os aspectos relacionados com biossegurança.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e dos fatores de virulência dos genes *iss* e *iutA* para *E. coli*, através da análise de swabs cloacais e de inglúvio de psitacídeos mantidos em cativeiro e também de amostras coletadas de diferentes órgãos em exames de necropsia de papagaios-charão (*Amazona pretrei*) da mesma procedência.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* utilizaram-se 44 amostras. Destas, 29 foram coletadas com o uso de swabs, sendo 14 de inglúvio e 15 de cloaca de psitacídeos, totalizando 15 aves amostradas, a maior parte destas papagaios-charão (*Amazona pretrei*), uma arara-canindé (*Ara ararauna*) e uma maitaca-verde (*Pionus maximiliani*). Também foram analisados 15 órgãos provenientes de exames necroscópicos de oito papagaios-charão, que tiveram morte espontânea e eram oriundos do mesmo local. O critério de escolha dos órgãos para análise microbiológica foi conforme observação de lesões macroscópicas. Foram avaliados sete fragmentos de intestino, quatro amostras de fígado, uma porção do proventrículo, uma de ventrículo, uma de cloaca e também uma amostra de fezes.

Os fragmentos de órgãos, swabs cloacais e de inglúvio foram incubados em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”) a 37°C por 24 horas. Posteriormente foi realizada semeadura em placa de Ágar Sangue e Ágar MacConkey e incubação a 37°C por 24 horas. Para análise de *Salmonella* spp. utilizou-se a metodologia descrita por Brasil (2003) com algumas modificações, onde alíquotas de 100µL e 1mL do caldo BHI foram inoculadas em caldos de enriquecimento seletivo, Rapaport Vassiliadis e Tetracionato respectivamente, e incubadas por 24 horas a 41°C. Posteriormente foram semeadas em Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e incubadas por 24 horas a 37°C. As placas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas à caracterização morfológica e bioquímica das colônias. Os meios utilizados na caracterização bioquímica foram “Triple Sugar Iron” (TSI), Citrato de Simmons, “Lysine Iron Agar” (LIA), meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM) e caldo Urease, após a identificação final as colônias bacterianas foram semeadas em Ágar Nutriente e estocadas a 5°C.

Foram selecionadas quatro amostras de *E. coli* representativas de duas aves submetidas à necropsia e de dois isolados de aves clinicamente saudáveis, e remetidas para o Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), para a realização de antibiograma pelo teste de disco-difusão e identificação final. Foram testados os seguintes antimicrobianos: Fosfomicina, Cloranfenicol, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Ampicilina, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Imipenem, Nitrofurantoína, Cefepime, Estreptomomicina, Ceftazidima, Tetraciclina, Sulfametoxazol Trimetoprim.

Um total de 28 amostras positivas no exame microbiológico para *Escherichia coli* foram submetidas à reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção dos fatores de virulência dos genes *iss* e *iutA*. Para a reação da polimerase em cadeia (PCR), o DNA foi extraído por fervura e quantificado em NanoDrop™ 1000 “spectrophotometer” (Thermo Scientific). A amplificação do DNA foi feita em solução com volume final de 25µL contendo 14,3µL de DNA e mistura para PCR com 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTPs, 10pmol de cada “primer” *iss* (5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC- 3' e 5'- CGC CTC GGG GTG GAT AA - 3') (Foley et al. 2000) ou *iutA* (5'- GGC TGG ACA TGG GAA CTG G -3' e 5'- CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG - 3') (Johnson & Stell 2000) e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Milão, Itália).

Para a análise do gene *iss* (760pb) a mistura foi submetida, em um termociclador (Mastercycler – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a uma temperatura de 94°C por cinco minutos e 30 ciclos de amplificação, compreendidos por desnaturação a 94°C durante um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C durante dois minutos. Após esses ciclos procedeu-se etapa final de 72°C por sete minutos. Para gene *iutA* (300pb) a amplificação consistiu de ciclo inicial de 94°C por cinco minutos, 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C durante um minuto, pareamento a 63°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos. Após seguiu-se etapa final de 72°C por dois minutos.

Os resultados foram obtidos após a corrida dos amplificadores

**Quadro 1. Isolamento de *Escherichia coli* de swabs de cloaca e inglúvio de psitacídeos**

Amostras	Isolamento positivo	Isolamento negativo	Total
Swab de cloaca	8	7	15
Swab de inglúvio	6	8	14
Total	14	15	29

por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (1X), a 90V, durante aproximadamente 45 minutos, corados com GelRed (Uniscience) e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. Foi utilizado marcador de peso molecular Ladder 100pb (Promega, Madison, WI).

## RESULTADOS

Das 29 amostras de swabs cloacais e de inglúvio analisadas obteve-se isolamento e caracterização bioquímica compatível com *Escherichia coli* em 14 amostras (Quadro 1). As aves analisadas nesta etapa eram consideradas saudáveis e não apresentavam sinais clínicos de colibacilose no período da coleta. Das 14 amostras onde se confirmou o isolamento de *E. coli*, 13 delas, correspondentes a dez aves, foram testadas para os fatores de virulência dos genes *iss* e *iutA*. Sendo que, dos oito swabs cloacais testados sete foram positivos para o gene *iss* (87,5%) e cinco foram positivos para o gene *iutA* (62,5%). Os cinco swabs de inglúvio analisados tiveram 100% de detecção do gene *iss*, e para o gene *iutA* obtivemos quatro amostras positivas o que representou 80%.

Todos os papagaios-charão necropsiados, em número de oito, tiveram o diagnóstico confirmado de colibacilose, pois além dos sinais clínicos compatíveis, a bactéria foi isolada de todas as amostras. No exame de necropsia constatou-se que as aves apresentavam estado nutricional que variou de bom a péssimo (Fig.1), para esta avaliação foi realizada inspeção visual e tátil da musculatura peitoral e gordura de cobertura do esterno e também pesagem individual das aves em balança de precisão, os pesos variaram de 165 a 243 gramas. Também foram constatadas lesões de aerossaculite, pericardite, perihepatite, hemorragias na



Fig.1. (A) Estado nutricional ruim indicado pela atrofia da musculatura peitoral e esterno proeminente e (B) estado nutricional bom sugerido pela musculatura peitoral desenvolvida, constatados nas necropsias de papagaios-charão (*Amazona pretrei*).

mucosa do intestino e tamponamento de cloaca. A análise dos órgãos das aves submetidas à necropsia demonstrou a detecção do gene *iss* em sete aves (85,7%) e do gene *iutA* em seis psitacídeos necropsiados. Dos sete isolados de *E. coli* provenientes do intestino foram detectados o gene *iss* em seis fragmentos (85,7%) e o gene *iutA* em cinco (71,4%). Das quatro amostras de fígado testadas, três (75%) foram positivas para os genes *iss* e *iutA* respectivamente. Os isolados do proventrículo, ventrículo e cloaca demonstraram expressão dos genes *iss* e *iutA* representando 100%. Já a amostra de fezes somente expressou o gene *iss* sendo negativa para o gene *iutA*.

Todos os isolados encaminhados para a Fiocruz obtiveram a confirmação para a bactéria *E. coli* e três deles foram classificados em *Escherichia coli* (rugosa) e uma amostra não aglutinou nos antíbiosos EPEC/EIEC. Com relação ao perfil de resistência uma amostra de *swab* cloacal foi resistente a cloranfenicol e cefoxitina e uma amostra de material analisado em necropsia mostrou-se resistente a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetropim. Os demais isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados (Quadro 2).

Os órgãos avaliados e o percentual de detecção dos genes de virulência, bem como a análise dos *swabs* cloacais

**Quadro 2. Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Escherichia coli***

Antimicrobianos	Origem das amostras de <i>Escherichia coli</i>			
	Órgão de necropsia	Órgão de necropsia	Swab de cloaca	Swab de cloaca
Fosfomicina	S	S	R	S
Cloranfenicol	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	R	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S
Ampicilina	R	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S
Ácido Nalidíxico	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S
Nitrofurantoína	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S
Estreptomicina	R	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S	S
Tetraciclina	R	S	S	S
Sulfametoxazol	R	S	S	S
Trimetoprim				

**Quadro 3. Fatores de virulência dos genes *iss* e *iutA*, em amostras de *Escherichia coli***

Amostras	Total de isolados analisados	Isolados positivos para os fatores de virulência	
		Gene <i>iss</i>	Gene <i>iutA</i>
<b>Isolados de necropsia</b>			
Intestino	7	6 (85,7%)	5 (71,4%)
Fígado	4	3 (75%)	3 (75%)
Proventrículo	1	1 (100%)	1 (100%)
Ventrículo	1	1 (100%)	1 (100%)
Cloaca	1	1 (100%)	1 (100%)
Fezes	1	1 (100%)	-
TOTAL NECROPSIA	15	14(93,3%)	11 (73,3%)
<b>Isolados por swab</b>			
Swab de cloaca	8	7 (85,5%)	5 (62,5%)
Swab de inglúvio	5	5 (100%)	4 (80%)
TOTAL SWABS	13	12 (92,3%)	9 (69,2%)
TOTAL GERAL	28	26 (92,8%)	20 (71,4%)

e de inglúvio, estão descritos no Quadro 3. Em nenhuma etapa deste estudo isolou-se *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

Neste estudo a bactéria *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma amostra submetida ao enriquecimento seletivo concordando com o demonstrando por Gopee et al. (2000) que relataram a baixa frequência de isolamento desta bactéria em aves silvestres de cativeiro quando comparada a mamíferos e répteis. Gaukler et al. (2009) analisaram 434 amostras de excretas de estorninhos-comum (*Sturnus vulgaris*) e encontraram *Salmonella* spp. em apenas três (0,69%) amostras. Marietto-Gonçalves et al. (2010) avaliaram 103 aves, em sua maioria psitacídeos, e detectaram a presença de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em três (2,9%) psitacídeos. Apesar deste estudo confirmar a baixa frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em aves silvestres não devemos menosprezar este patógeno, pois uma vez presente poderá determinar sinais clínicos severos e mortalidade elevada. Segundo Allgayer et al. (2009), informações sobre a ocorrência e distribuição de *Salmonella* spp. em animais selvagens e domésticos são fundamentais para detectar os possíveis reservatórios responsáveis pela manutenção e disseminação deste agente.

Uma hipótese para a elevada taxa de detecção de *Escherichia coli* nas aves analisadas se deve ao fato de serem aves silvestres criadas em cativeiro passíveis de estresse crônico. Godoy (2007) relata que a colibacilose é frequente em psitacídeos mantidos em local com grande número de indivíduos, onde há facilidade na dispersão da bactéria pela contaminação fecal da água, do alimento e ambiente onde as aves vivem. Mattes et al. (2005) demonstraram que a adoção de medidas simples de biossegurança, como desinfecção diária dos comedouros e bebedouros, baixa densidade de aves alojadas, restrição do contato com aves de espécies diferentes, recintos com tela e piso que facilite a limpeza, reduz a contaminação por *E. coli* em psitacídeos cativos. Estes aspectos eram seguidos pelo criador, exceto o piso dos recintos que era de terra, o que pode favorecer a persistência de patógenos no ambiente. Friend & Frauson (1999) descreveram que aves com colibacilose podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como postura sonolenta, eriçamento de penas, diarreia, poliúria e anorexia. A não manifestação de sinais clínicos e o isolamento de *E. coli* nos psitacídeos submetidos a *swabs* cloacais e de inglúvio pode ser atribuído a este fato.

Segundo Silveira et al. (1994) somente a detecção do plasmídeo contendo o gene *iss* não é suficiente para caracterizar uma cepa de *E. coli* como patogênica, mas este gene pode ser considerado como marcador de virulência, pois o gene *iss* é o mais prevalente em cepas de isolados de aves doentes (Delicato et al. 2003, Foley et al. 2003, Nolan et al. 2003, Ozawa et al. 2008). Na avaliação dos fatores de virulência presentes nos isolados provenientes de *swabs* encontraram-se resultados semelhantes, pois os *swabs* de inglúvio foram todos positivos para o gene *iss* e somente em um isolado não foi demonstrado o gene *iutA*. Apesar de estas aves terem sido classificadas como saudáveis, não

descartamos a possibilidade de cepas patogênicas de *E. coli* estarem circulando nesta população de psitacídeos, uma vez que foram detectados ambos os fatores de virulência e serem aves da mesma procedência das aves submetidas a necropsia, nas quais colibacilose foi confirmada como causa da morte.

Gaukler et al. (2009) avaliaram 206 isolados de *E. coli* em amostras de fezes de *Sturnus vulgaris* selvagens e não encontraram nenhuma amostra positiva para o gene *iutA* embora ele seja comumente isolado de APEC. Já o gene *iss* foi detectado em todos os isolados classificados como patogênicos, indicando que o gene *iss* é mais comum em aves selvagens e tem maior correlação com a patogênese da doença. O mesmo ocorreu com a amostra de fezes do nosso estudo a qual foi negativa para o gene *iutA* e positiva para o gene *iss*, corroborando que o gene *iutA* não seja usualmente detectado em amostras de fezes de aves.

Somente uma amostra de necropsia foi negativa para o gene *iss* demonstrando variabilidade na expressão desse gene em cepas consideradas patogênicas quando comparada com os resultados obtidos por Knöbl et al. (2008), que avaliaram diversos fatores de virulência para *E. coli* em fragmentos de órgãos de oito papagaios necropsiados, com causa da morte atribuída a colibacilose, e obtiveram três amostras positivas para o gene *iss*. Em estudo posterior Knöbl et al. (2011) pesquisaram genes de virulência para *E. coli* em 24 psitacídeos e detectaram o gene *iss* em apenas sete amostras, sendo estas correspondentes a quatro amostras de *swabs* cloacais e três de fragmentos de órgãos. Abreu et al. (2010) detectaram a presença do gene *iss* em 55% das cepas de *Escherichia coli* isoladas da traqueia de codornas destinadas ao abate. Delicato et al. (2003) encontraram 38,5% de positivos em isolados traqueais e de fígado de aves com colibacilose quando testadas para o gene *iss*. Ewers et al. (2007) detectaram o gene *iss* em 84% dos isolados de APEC. Ikuno et al. (2008) avaliaram 57 isolados de *E. coli* provenientes de aves silvestres submetidas à quarentena e encontraram 26,6% de positivos para gene *iss*. Estes resultados reforçam a alta taxa de positividade para o gene *iss* encontradas no presente artigo, onde 93,3% das amostras de órgãos apresentaram este gene e 92,3% das amostras de *swabs* foram positivas.

O gene *iutA* foi positivo para 73,3% das amostras de órgãos estudadas, 69,2% das amostras de *swabs* cloacais e em 92,3% dos *swabs* de ingluvío, resultado semelhante aos trabalhos de Delicato et al. (2003) que encontraram 63% de amostras positivas para o gene *iutA* em isolados de galinhas com colibacilose e Trampel et al. (2007) que descreveram a presença deste gene em quatro galinhas, de um total de cinco, com lesões de peritonite. Yaguchi et al. (2007) avaliaram 125 amostras de *E. coli* de frangos de corte com lesões de colisepticemia e encontraram o gene *iutA* em 74,4% destes isolados.

Foram detectados anticorpos para *Salmonella Pullorum* em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de vida livre e cativo demonstrando que mesmo espécimes de vida livre podem ser portadores da bactéria (Deem et al. 2005). O isolamento de *Salmonella Bredney* em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre (Vilela et al. 2001)

também sugere a existência de estado portador em espécies onde a relação hospedeiro e parasita é equilibrada. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os psitacídeos avaliados não apresentam potencial de disseminação de *Salmonella* spp., uma vez que a bactéria não foi isolada de nenhuma amostra analisada. Devemos considerar a não realização de amostragens seriadas para descartar um estado portador do agente, mas o constante acompanhamento das aves do criador após o estudo seja por exame clínico ou de necropsia seguidos da avaliação bacteriológica, não confirmou esta hipótese.

Comprovou-se o elevado potencial de virulência de *E. coli*, tanto das amostras de aves consideradas saudáveis como das aves mortas em decorrência da colibacilose, uma vez que os genes *iss* e *iutA* foram expressos na maior parte dos isolados de *E. coli* testados. É fundamental a monitoria para *E. coli* e outras enterobactérias em criadouros de aves silvestres, sobretudo psitacídeos, devido ao risco de disseminação destes patógenos nos recintos que ocorre geralmente pela presença de aves portadoras assintomáticas, pois além de contaminarem o ambiente podem manifestar sinais clínicos na presença de fatores estressantes, como mudanças no manejo, período reprodutivo e superlotação, e assim desequilibrar o estado hospedeiro/parasita. Em decorrência da patogenicidade de *E. coli* para psitacídeos a taxa de mortalidade pode ser elevada principalmente quando não são adotadas medidas profiláticas como a desinfecção diária de comedouros e bebedouros, baixa lotação e nutrição adequada para a espécie livre de contaminação por microrganismos patogênicos.

**Agradecimentos.**- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI), pela concessão de bolsa de mestrado ao autor Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa. Aos proprietários do Criadouro Comercial que permitiram a realização das coletas. À equipe do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA/UFMS). Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pela parceria no processamento das amostras.

## REFERÊNCIAS

- Abreu D.L.C., Franco R.M., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Alves F.M.X. & Almeida J.F. 2010. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *ISS* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. *Pesq. Vet. Bras.* 30:406-410.
- Allgayer M.C., Oliveira S.J., Mottin V.D., Loiko M.R., Abilleira F., Guedes N.M.R., Passos D.T. & Weimer T.A. 2009. Isolamento de *Salmonella* Branderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Ciência Rural* 39: 2542-2545.
- Brasil 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Portaria número 62 de 26 de agosto de 2003, Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, Brasília.
- Bangert R.L., Cho B.R., Widders P.R., Stauber E.H. & Ward A.C.S. 1988. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Dis.* 32:46-52.
- Chouikha I., Bree A., Moulin-Schouleur M., Gilot P. & Germon P. 2008. Differential expression of *iutA* and *ibeA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. *Microb. Infect.* 10:432-438.
- Deem S.L., Noss A.J., Cuéllar R.L. & Karesh W.B. 2005. Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. *J. Zoo Wildlife Med.* 36:598-605.
- Delicato E.R., Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. 2003. Virulence-asso-

- ciated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103.
- Ewers C., Li G., Wilking H., Kiebling S., Alt K., Antão Esther-Maria, Laturus C., Diehl I., Glodde S., Homeier T., Böhnke U., Steinrück H., Philipp H. & Wieler L.H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297:163-176.
- Flammer K. & Drewes L.A. 1988. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. *Avian Dis.* 32:79-83.
- Foley S.L., Horne S.M., Giddings C.W., Robinson M. & Nolan L.K. 2000. Iss from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 44: 185-191.
- Foley S.L., Horne S.M., Giddings C.W., Gustad T.R., Handegard E.D., Robinson M. & Nolan L.K. 2003. Monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. *Avian Dis.* 47:79-86.
- Friend M. & Frason J.C. 1999. Field manual of wildlife diseases, general field procedures and diseases of birds. USGS, Madison, 440p.
- Gast R.K. 2003. *Salmonella* infections, p.567-613. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E. (Eds), *Diseases of Poultry*. 11<sup>th</sup> ed. Iowa State Press, Ames.
- Gaukler S.M., Linz G.M., Sherwood J.S., Dyer N.W., Bleier W.J., Wannemuehler Y.M., Nolan L.K. & Logue C.M. 2009. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Wild European starlings at a Kansas cattle feedlot. *Avian Dis.* 53:544-551.
- Gerlach H. 1994. Bacteria, p.949-983. In: Ritchie B.W., Harrison G.J. & Harrison L.R. (Eds), *Avian Medicine: Principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth.
- Godoy S.N. 2007. Psittaciformes (arara, papagaio, periquito), p.222-251. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens*. Roca, São Paulo.
- Gopee N.V., Adesiyun A.A. & Caesar K. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *J. Wildl. Dis.* 36:284-293
- Harrison G.J. & McDonald D. 1996. Nutritional considerations-section II: nutritional disorders, p.108-140. In: Harrison G.J. & Lightfoot T.L. (Eds), *Clinical Avian Medicine*. Vol.1. Spix Publishing, Palm Beach.
- Hirsh D.C., MacLachlan N.J. & Walker R.L. 2004. *Veterinary Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell, Massachusetts. 536p.
- Hofer E., Silva Filho S.J. & Reis E.M.F. 1997. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 17:55-62.
- Ikuno A.A., Gama N.M.S.Q. Guastalli E.A.L., Guimarães M.B. & Ferreira V.C.A. 2008. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. *Anais 35<sup>o</sup> Conbravet*, Gramado, RS. (Resumo)
- Johnson J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:80-128.
- Johnson J.R. & Stell A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181: 261-272.
- Johnson T.J., Skyberg J. & Nolan L.K. 2004. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis.* 48:351-360.
- Knöbl T., Godoy S.N., Matushima E.R., Guimarães M.B. & Ferreira A.J.P. 2008. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 45(supl.):54-60.
- Knöbl T., Saidenberg A.B.S., Moreno A.M., Gomes T.A.T., Vieira M.A.M., Leite D.S., Blanco J.E. & Ferreira A.J.P. 2011. Serogroups and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. *Pesq. Vet. Bras.* 31:916-921.
- Marietto-Gonçalves G.A., Almeida S.M., Lima E.T., Okamoto A.S., Pinczowski P. & Andreatti Filho R.L. 2010. Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). *Avian Dis.* 54:151-155.
- Mattes B.R., Consiglio S.A.S., Almeida B.Z., Guido M.C., Orsi R.B., Silva R.M., Costa A., Ferreira A.J.P. & Knöbl T. 2005. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. *Arq. Inst. Biol.* 72:13-16.
- Menão M.C., Bottino J.A., Biasia I., Ferreira C.S.A., Calderaro F.F., Tavechio A.L., Fernandes S. & Ferreira A.J.P. 2000. Infecção por *Salmonella* Typhimurium em Arara Azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 67:43-47.
- Nolan L.K., Horne S.M., Giddings C.W., Foley S.L., Johnson T.J., Lynne A.M. & Skyberg J. 2003. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet. Res. Commun.* 27:101-110.
- Orós J., Rodríguez J.L., Fernández A., Herráez P., Espinosa de los Monteros A. & Jacobson E.R. 1998. Simultaneous occurrence of *Salmonella* arizonae in a sulfur crested cockatoo (*Cacatua galerita galerita*) and iguanas. *Avian Dis.* 42:818-823.
- Orosz S.E., Chengappa M.M., Oyster R.A., Morris P.J., Trock S. & Altekruze S. 1992. *Salmonella* enteritidis infection in two species of psittaciformes. *Avian Dis.* 36:766-769.
- Ozawa M., Harada K., Kojima A., Asai T. & Sameshima T. 2008. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Dis.* 52:392-397.
- Sigrist T. 2006. *Aves do Brasil: uma visão artística*. Avis Brasilis, São Paulo. 672p.
- Silveira W.D., Fantinatti F. & Castro A.F.P. 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. *Revta Bras. Genética* 17:9-14.
- Trampel D.W., Wannemuehler Y. & Nolan L.K. 2007. Characterization of *Escherichia coli* isolates from peritonitis lesions in commercial laying hens. *Avian Dis.* 51:840-844.
- Vidotto M.C., Terra V.A., Lima G.S., Alfieri A.F., Goes C.R. & Cação J.M. 1994. Iron-regulated outer-membrane proteins of strains of avian septicemic *Escherichia coli*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:1291-1297.
- Vilela V.O., Guedes N.M.R., Araújo F.R., Solari C.A., Filiú W.F.O., Catelan V.L., Alves M.M., Carmo M.A., Souza R.A. & Vargas F.C. 2001. *Salmonella* Bredeney em arara-azul *Anodorhynchus hyacinthinus*. *Ornitologia sem Fronteiras e Resumos do IX Congresso Brasileiro de Ornitologia*. Straube F.C. (Ed.). Curitiba, PR, p.394-395.
- Ward M.P., Ramer J.C., Proudfoot J., Garner M.M., Juan-Sallés C. & Wu C.C. 2003. Outbreak of Salmonellosis in a zoologic collection of Lorikeets and Lories (*Trichoglossus*, *Lorius*, and *Eos* spp.). *Avian Dis.* 47:493-498.
- Yaguchi K., Ogitan T., Osawa R., Kawano M., Kokumai N., Kaneshige T., Noro T., Masubuchi K. & Shimizu Y. 2007. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. *Avian Dis.* 51:656-662.