

Comunicação

[Communication]

Infecção sistêmica por *Salmonella Typhimurium* em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

[Systemic Infection by *Salmonella Typhimurium* in Blue-fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*)]

M.L. Souza^{1,2}, L.B.S. Azuaga³, C.R.M. Coutinho Netto³, D.C. Gomes⁴,
C.A.N. Ramos⁴, C.R.B. Leal⁴

¹Programa de Residência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

²Aluna de pós-graduação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande, MS

³Centro de Reabilitação de Animais Silvestres - PMCG - Campo Grande, MS

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

A manutenção de animais silvestres em cativeiro domiciliar é uma prática comum no Brasil. Os papagaios são os preferidos, por serem considerados curiosos, inteligentes e divertidos, serem excelentes imitadores e faladores. Entretanto, podem ser fonte de infecção de algumas zoonoses (Bonello, 2006). O comércio clandestino de animais silvestres é classificado como a terceira maior atividade ilícita do mundo, perdendo apenas para o tráfico de drogas e de armas.

Animais recolhidos em apreensões muitas vezes se encontram em condições inadequadas e com o estado geral de saúde comprometido, sendo, portanto, suscetíveis às diversas infecções e doenças sistêmicas (Carciofi e Saad, 2001). Quando não há condições de serem reintroduzidos na natureza, terminam a vida em zoológicos, ou são enviados aos centros de reabilitação (Vanstreels *et al.*, 2010).

Salmonella Typhimurium é um dos 1.547 sorotipos pertencentes ao grupo da *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, sendo os sorotipos Typhimurium e Enteritidis encontrados em aves. Esses sorotipos são os de principal importância para a saúde pública. A *Salmonella* é causadora de toxinfecções alimentares em seres humanos, e, em um estudo realizado em 2010 por Majowicz *et al.* (2010), estima-se a ocorrência de aproximadamente 93,8 milhões de casos

humanos relacionados à *Salmonella* anualmente em todo o mundo. *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são sorotipos invasivos, que podem contaminar vários órgãos e causar infecções septicêmicas.

O objetivo deste trabalho foi relatar a mortalidade de papagaios-verdadeiros, mantidos em cativeiro, por *Salmonella Typhimurium*.

As aves relatadas neste estudo são popularmente chamadas de papagaios-verdadeiros e pertencem à ordem Psittaciformes, família Psittacidae, espécie *Amazona aestiva*. São aves nativas do Brasil e distribuem-se pelo interior da América do Sul, entre Bolívia, Paraguai e Argentina.

As aves foram apreendidas ainda filhotes em Itaquiraí-MS e Ivinhema-MS, em outubro de 2015, e encaminhadas ao Centro de Reabilitação de Animais silvestres (CRAS) em Campo Grande - Mato Grosso do Sul. Muitas morreram no transporte e durante a estadia no CRAS. Aquelas que sobreviveram foram mantidas em quarentena e depois introduzidas em um recinto de voo com 60m² de área total, contendo cerca de 250 papagaios. Em fevereiro de 2016, quando os papagaios possuíam uma idade estimada de seis meses, começaram a apresentar sinais clínicos, como letargia, polidipsia, diarreia, desidratação, conjuntivite, alterações respiratórias, e começaram a vir a óbito

Recebido em 5 de março de 2017

Aceito em 22 de junho de 2017

E-mail: vet.michelli@gmail.com

subitamente. Algumas aves foram encaminhadas ao Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

No setor de anatomia patológica do HV, 17 aves foram necropsiadas e pôde-se observar que apresentavam escore corporal regular e mediam cerca de 25cm, quando o valor normal para a espécie a partir dos quatro meses de idade é de cerca de 35cm. As penas da cauda estavam sujas de fezes e a plumagem, em geral, apresentava falhas. No sistema cardiovascular, observou-se conteúdo amarelado e gelatinoso no saco pericárdico, além de numerosas petéquias. No sistema respiratório, observou-se hemorragia focal em saco aéreo torácico. No sistema hematopoiético, o baço estava levemente aumentado de tamanho, possuindo pontos amarelados multifocais nas superfícies natural e de corte. O fígado estava moderadamente aumentado de tamanho, com pontos multifocais amarelados por todo o órgão. Ao exame histopatológico do fígado, do baço e dos pulmões, havia agregados bacterianos distribuídos pelos órgãos. Na mucosa do intestino delgado, havia quantidade moderada de plasmócitos e linfócitos, caracterizando uma enterite linfoplasmocítica.

Devido ao tempo decorrido após o óbito dos animais, não foi possível realizar exames bacteriológicos de todas as aves inicialmente necropsiadas. Dessa forma, fragmentos de fígado e baço de três animais foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia do HV para cultura bacteriana. As amostras foram inicialmente semeadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI). Vinte e quatro horas após a semeadura, observou-se o crescimento de colônias cremosas, circulares, de tamanho pequeno e brilhosas. Deu-se início a identificação bacteriana com base nas características morfotintórias pela coloração de Gram. A confirmação foi realizada de acordo com as características bioquímicas em meios específicos. Os resultados das provas bioquímicas indicaram que se tratava de uma bactéria fermentadora de glicose, não fermentadora de lactose, produtora de gás e de H₂S, móvel, com indol negativo e citrato positivo. Essas características são compatíveis com o gênero *Salmonella* spp.

A confirmação do gênero foi realizada por soroaglutinação em lâmina, utilizando-se soro *Salmonella* polivalente (Probac do Brasil®).

Para confirmação definitiva dos resultados encontrados, as amostras provenientes do isolamento microbiológico foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do HV para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para tanto, DNA foi obtido por termólise, e PCR para o gene *fliC* (flagelin gene) foi realizada com os *primers* FlicF (5'-CCTGTCGCTGTTGACCCAGA-3') e FlicR (5'-GAGAGGACGTTTTGCGGAACC-3'). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer-Blast (Ye et al., 2012). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25µL contendo 2.5ul de PCR 10x buffer (20mM de Tris-HCl pH 8.3, 50mM de KCl), 1.5mM de MgCl, 0,2mM de cada deoxynucleosideo triphosphatado, 10pmol de cada *primer*, 1.5U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 100ng de DNA genômico. A termociclagem foi realizada como descrito a seguir: desnaturação inicial a 95°C por três minutos, 30 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 1:30min, anelamento a 57°C por 30seg e extensão a 72°C por 1:30min, seguidos por uma extensão final a 72°C por dois minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1% e sequenciado em ambas as direções pelo método de Sanger em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Os cromatogramas foram avaliados e editados com o auxílio do programa BioEdit v.7.2.5 (Hall et al., 1999), e as sequências consenso foram submetidas ao programa BLASTn (Altschul et al., 1990) para determinar a identidade por comparação com sequências de DNA depositadas no GenBank – NCBI. Identidade de 98% foi observada com sequências de *Salmonella* Typhimurium. A sequência foi depositada no Genbank.

Segundo Friend e Franson (1999), a transmissão de *Salmonella* ocorre principalmente pela via fecal-oral, pelo contato direto entre animais infectados e pela ingestão de água e de alimentos contaminados. Os fatores desencadeantes para o surgimento da doença são: estresse, imunossupressão, dose infectante com a qual o animal entrou em contato, via de transmissão, espécie e idade dos acometidos, se o animal

apresenta alguma doença concomitante e o sorotipo de *Salmonella* spp. envolvido.

Os sinais clínicos para salmonelose são inespecíficos, mas, em sua maioria, é possível observar a presença de aves com sonolência, tendência das aves amontoarem-se junto à fonte de calor, anorexia severa, aumento do consumo de água, retardo no crescimento, falhas no empenamento, desidratação, enterocolite aguda com diarreia, emplastamento das penas ao redor da cloaca, cegueira, conjuntivite e morte súbita (Back, 2010). Muitos dos sinais relatados por Back (2010) foram encontrados nas aves analisadas, que tinham tamanho inferior ao ideal para a espécie e a idade, cerca de 10cm a menos, falhas no empenamento, e apresentavam sinais clínicos de letargia, polidipsia, diarreia, desidratação, conjuntivite e alterações respiratórias, reforçando a confirmação de que o quadro clínico consistia em salmonelose.

Karesh *et al.* (1997) mostraram, por meio de testes sorológicos, que pássaros de cativeiro eram soropositivos para *Salmonella* Pullorum, enquanto os de vida livre foram negativos, demonstrando a facilidade da disseminação de patógenos entre os animais quando esses estão aglomerados em recintos. Esses animais se alimentam e defecam em grande densidade no mesmo recinto, o que aumenta a probabilidade de uma contaminação fecal-oral de *Salmonella* e outros patógenos.

Para a prevenção e o controle da disseminação de patógenos em aves de cativeiro, boas condutas de higiene devem ser tomadas. A desinfecção do ambiente deve ser periódica e o recinto deve ter boa ventilação. O controle populacional dentro do recinto também deve ser monitorado. Deve-se reduzir o estresse ambiental e de manipulação, e os animais devem ser mantidos com uma ótima nutrição (Marietto-Gonçalves *et al.*, 2010).

Carciofi e Saad (2001) atentam para a questão do manejo nutricional, afirmando que as aves subnutridas têm a capacidade imunológica reduzida e são mais suscetíveis a infecções e doenças sistêmicas, além de terem a capacidade reprodutiva reduzida. As enfermidades de aves em cativeiro, no Brasil, estão frequentemente associadas com manejo inadequado, envolvendo aspectos nutricionais, comportamentais e instalações.

Refsum *et al.* (2002) realizaram um estudo retrospectivo no período de 1969 a 2000, na Noruega, analisando registros de 470 pássaros de vida livre laboratorialmente confirmados para *Salmonella*, e em 100% dos animais avaliados o sorotipo encontrado foi *Salmonella* Typhimurium, sendo o mesmo sorotipo encontrado em humanos, em outros trabalhos, no mesmo período. Acredita-se que a presença das aves pode ser um fator desencadeante para a transmissão dos patógenos das aves para os humanos.

No estudo de Bonello (2006) para avaliar o manejo e o potencial zoonótico de papagaios-verdadeiros mantidos em cativeiro domiciliar, foi constatado que a maioria das pessoas mantém as aves, mas não tem conhecimento básico de suas necessidades e hábitos de vida, criando-as como *pets*, com manejo nutricional e sanitário inadequados. Esses proprietários têm um estreito contato com as aves e desconhecem as possíveis enfermidades que elas podem transmitir. Dessa forma, é possível avaliar que, assim, a criação de animais silvestres pode constituir um problema de saúde pública.

A melhor forma de evitar a infecção tanto de animais quanto de humanos por *Salmonella* é por meio da prevenção, portanto devem-se manter as aves em quarentena para observar alguma manifestação clínica de enfermidades, evitar que elas passem por estresse, diminuir a quantidade de animais que vivem em um mesmo recinto, dar uma boa alimentação e ter cuidados com higiene, limpando e desinfetando frequentemente gaiolas, recintos, bebedouros e comedouros. Ter sempre o acompanhamento veterinário e, se possível, reintroduzi-las à natureza o mais rápido possível. Os humanos também devem prevenir-se lavando mãos e braços após manusear a ave e fazer a limpeza de gaiolas, não deixar a ave próxima de locais onde os humanos alimentam-se e consumir alimentos devidamente inspecionados.

Este trabalho pôde demonstrar a importância e os impactos de encontrar *Salmonella* spp. em recintos onde muitos animais dividem o mesmo espaço, como CRAS, CETAS, zoológicos e criações, onde os animais ficam mais suscetíveis a infecções e onde há facilidade de disseminação de patógenos entre eles.

Palavras-chave: PCR, Psittaciformes, salmonelose

ABSTRACT

The maintenance of wild animals in captivity can be a source for transmission of infectious and zoonotic diseases. In February 2016, blue-fronted amazon parrots that were kept at the Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) of Campo Grande - MS died suddenly. The specimens were sent to the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) to be necropsied. Anatomopathological exams were performed and organ fragments from all systems were collected for histopathological exams. Liver and spleen fragments were also collected for bacteriological exams. Histopathological exam revealed bacterial aggregates distributed through the organs. Bacteriological exam isolated *Salmonella* spp. from the fragments of liver and spleen. The confirmation of the genus was made by serum agglutination on slide and by the polymerase chain reaction (PCR). The genetic sequencing identified the sample as *Salmonella Typhimurium*.

Keywords: PCR, psittaciformes, salmonellosis

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, p.403-410, 1990.
- BACK, A. *Manual de doenças de aves*. 2.ed. Cascavel, PR: Integração, 2010. 311p.
- BONELLO, F.L. *Avaliação do manejo e do potencial zoonótico de papagaios-verdadeiros (Amazona aestiva) mantidos em cativeiro domiciliar*. 2006. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, SP.
- CARCIOFI, A.C.; SAAD, C.E.P. Nutrition and nutritional problems in wild animal. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S (Eds.). *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p.425-434.
- FRIEND, M.; FRANSON, J.C. *Field manual of wildlife diseases, general field procedures and diseases of birds*. Washington: USGS, 1999. 426p.
- HALL, R.E.; KESTLER, D.P.; AGARWAL, S.; GOLDSTEIN, K.M. Expression of the monocytic differentiation/activation factor P48 in *Mycoplasma* species. *Microb. Pathog.* v.27, p.145-153, 1999.
- KARESH, W.B.; CAMPO A.D.; BRASELTON, W.E.; PUCHE, H. *et al.* Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. *J. Zoo Wildl Med.* v.28, p.368-377, 1997.
- MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.*, v.50, p.882-889, 2010.
- MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; ALMEIDA, S.M.; LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação para soltura. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.47, p.185-189, 2010.
- REFSUM, T.; HANDELAND, K.; BAGGESEN, D.L.; HOLSTAD, G. *et al.* Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Am. Soc. Microbiol.* v.68, p.5595-5599, 2002.
- VANSTREELS, R.E.T.; TEIXEIRA, R.H.F.; CAMARGO, L.C.; NUNES, A.L.V. *et al.* Impacts of animal traffic on the Brazilian Amazon parrots (*Amazona* species) collection of the Quinzinho de Barros Municipal Zoological Park, Brazil, 1986-2007. *Zoo Biol.* v.29, p.600-614, 2010.
- YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinf.*, v.13, p.134, 2012.