

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte**

**Priscila Alves Dias**

Pelotas, 2015

**Priscila Alves Dias**

***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm

Coorientadora: Cecilia Calabuig

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

D541cDias, Priscila Alves

Campylobacter spp., Salmonella enterica e Yersinia enterocolitica em aves silvestres e frangos de corte / Priscila Alves Dias ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Cecilia Calabuig, coorientadora. — Pelotas, 2015.  
55 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Patógenos. 2. Aviários. 3. Sicalis flaveola. 4. Chrysomus ruficapillus. 5. Zonotrichia capensis. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Calabuig, Cecilia, coorient. III. Título.

CDD: 636.5

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Priscila Alves Dias

*Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)  
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Cecilia Calabuig  
Doutor em Ecologia pela Universidade de Sevilla, Espanha

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Natacha Deboni Cereser  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da bolsa de estudos durante o período de realização do projeto.

Ao professor Dr. Cláudio Dias Timm, meu orientador desde a graduação, pelos ensinamentos passados durante nossos 10 anos de trabalho e convivência.

A professora Dra. Cecilia Calabuig, que aceitou o desafio da coorientação à distância, se mostrando sempre disposta a ajudar e “fazer” campo.

Aos colegas, funcionários e professores do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, especialmente às queridas estagiárias Charlene Cunha, Daiane Wilsmann, Júlia Heinen e Thamíris Pereira de Moraes, pela paciência, dedicação e convivência nesse período.

A minha família, pelo amor incondicional, incentivo e apoio, sempre...

Muito obrigada!!!

## Resumo

DIAS, Priscila Alves. ***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte.** 2015. 55f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* estão entre os micro-organismos mais comumente associados a toxinfecções alimentares envolvendo o consumo de produtos de origem animal. As aves têm sido identificadas como reservatórios, atuando como possíveis propagadoras desses micro-organismos. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* e *S. enterica* em frangos de corte e em aves silvestres, identificar as espécies de aves silvestres presentes na região sul do Brasil e quais podem ser portadoras de patógenos, pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados de *Campylobacter* e identificar os sorotipos de *Salmonella* encontrados. As aves silvestres foram capturadas próximas a lavouras de arroz e aviários com redes de neblina e soltas após a coleta. Amostras de fezes, 200 de frangos e 214 de aves silvestres de várias espécies, foram coletadas diretamente da cloaca com uso de zaragatoas e processadas para pesquisa de *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica*. *Campylobacter* spp. foi isolado de *Chrysomus ruficapillus* (Garibaldi) e *Zonotrichia capensis* (Tico-tico), e *Salmonella* isolada de *Sicalis flaveola* (Canário-da-terra). De frangos foram isolados *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica*. Os mesmos micro-organismos foram isolados de fezes de frangos e aves silvestres capturadas no entorno dos mesmos aviários, sugerindo que ocorra uma contaminação mútua entre os dois grupos de animais.

**Palavras-chave:** patógenos; aviários; *Sicalis flaveola*; *Chrysomus ruficapillus*; *Zonotrichia capensis*

## Abstract

DIAS, Priscila Alves. ***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in wild birds and broilers.** 2015. 55f. Theses (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* are among the most commonly microorganisms associated with food intoxication involving the consumption of animal products. The birds have been identified as reservoirs, acting like possible propagators of these microorganisms. In this context, the study aimed to verify the occurrence of *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* and *S. enterica* in broilers and wild birds, identify the species of wild birds present in south Brazil and which may harbor pathogens, search the presence of genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* in isolated *Campylobacter* and identify serotypes *Salmonella* found. Wild birds were captured near rice fields and aviaries with mist nets and released after collection. Faeces samples, 200 of broilers and 214 of wild birds, were collected directly from the cloaca using swabs and processed for *Campylobacter* spp., *S. enterica* and *Y. enterocolitica* research. *Campylobacter* spp. was isolated from *Chrysomus ruficapillus* (Garibaldi) and *Zonotrichia capensis* (Tico-tico), and *Salmonella* isolated from *Sicalis flaveola* (Canário-da-terra). *Campylobacter* spp., *S. enterica* and *Y. enterocolitica* were isolated from broilers. The same microorganisms were isolated from broilers and wild birds faeces captured in the vicinity of the same aviaries, suggesting a mutual contamination between the two groups of animals.

**Keywords:** pathogens; aviaries; *Sicalis flaveola*; *Chrysomus ruficapillus*; *Zonotrichia capensis*

## Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> usados na diferenciação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> .....	29
Tabela 2	<i>Primers</i> usados na pesquisa dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> ....	30
Tabela 3	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> .	30
Tabela 4	Espécies capturadas no entorno dos aviários	31
Tabela 5	Número de aviários, animais amostrados e amostras positivas para <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella enterica</i> e <i>Campylobacter</i> spp.....	33

## Lista de Abreviaturas

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CBRO	Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDT	Toxina citoletal distensiva
<i>cdt</i>	Genes da toxina citoletal distensiva
CEMAVE	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
FBP	Piruvato de sódio, bissulfato de sódio, sulfato de ferro
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
g	Gramas
<i>g</i>	Gravidade
h	Horas
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
L	Litro
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligrama
µg	Micrograma
µg/µL	Micrograma/microlitro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
m/v	Massa/volume
N <sub>2</sub>	Nitrogênio

ng	Nanograma
nM	Nanômetro
nmol/ $\mu$ L	Nanomol/microlitros
O <sub>2</sub>	Oxigênio
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
%	Porcentagem
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
pmol	Picomol
UI	Unidade internacional

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Artigos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Artigo 1.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Artigo 2.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Considerações Finais.....</b>	<b>45</b>
<b>Referências.....</b>	<b>46</b>

## 1 Introdução

O Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango, com produção de 12.645 milhões de toneladas em 2012, sendo 3.918 mil toneladas destinadas para exportação. O consumo anual *per capita* de carne de frango pelos brasileiros é de 45 kg, de acordo com dados publicados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2015). O desenvolvimento e a tecnificação da produção e industrialização de produtos de origem animal, principalmente no setor avícola, resultaram em melhorias das condições higiênico-sanitárias. Porém, apesar dos avanços, ainda são observados surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) de origem avícola (NADVORNY et al, 2004). A carne de frango é um ótimo substrato para o desenvolvimento de micro-organismos capazes de causar toxinfecções alimentares, como *Salmonella*, *Campylobacter* e *Yersinia*. Segundo o centro de vigilância epidemiológica dos EUA, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), é estimado que 48 milhões de DTA ocorram a cada ano. Entre as zoonoses bacterianas mais notificadas estão salmonelose e campylobacteriose, seguidas por yersiniose (CDC, 2014). Em 2014 nos EUA, um surto de *Salmonella* acometeu 363 pessoas que mantinham contato direto com frangos em produção. Em outro caso, *S. Heidelberg* foi isolada de carne de frango mecanicamente separada (CDC, 2015). No Brasil, foram notificados ao Ministério da Saúde 8.663 casos de surtos de DTA entre 2000 e 2011 e *Salmonella* foi o principal agente etiológico identificado (BRASIL, 2011).

Com a finalidade de melhorar a qualidade dos produtos avícolas destinados aos mercados nacional e internacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que constitui uma importante ferramenta de vigilância, controle e erradicação das principais doenças aviárias que possuem impacto na saúde pública (BRASIL, 1994). A monitoria de *Salmonella* é uma necessidade da indústria avícola brasileira. A Instrução Normativa nº78 (BRASIL, 2003) define as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livres de *Salmonella*

Gallinarum e *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Porém, o *Campylobacter* não faz parte das doenças monitoradas pelos órgãos brasileiros de defesa sanitária, pois este micro-organismo é essencialmente não patogênico para as aves (GERMANO & GERMANO, 2003), não representando um problema para os sistemas de produção avícola. Entretanto, pelo seu potencial zoonótico e participação das aves no ciclo epidemiológico merece maior atenção por parte dos órgãos de defesa sanitária. Os frangos podem ser portadores de *Campylobacter* em seus tratos intestinais, sendo os seus produtos o principal alimento veiculador desta bactéria para humanos. No Brasil, as porcentagens de contaminação em fezes de frango podem chegar a 96,6% (CHAVES et al, 2010). Embora *Yersinia* também cause problemas à saúde pública, assim como *Campylobacter*, não há programas de controle e monitoramento para bactérias desse gênero em frangos de corte.

*Salmonella enterica* subespécie *enterica* é uma bactéria da família Enterobacteriaceae que, em aves, pode causar três doenças distintas: pulorose (sorotipo Pullorum), tifo aviário (sorotipo Gallinarum) e paratifo aviário (causado pelos demais sorotipos que não sejam os anteriores). De aproximadamente 2.600 sorotipos conhecidos de *S. enterica* subsp. *enterica*, cerca de 90 são comuns em casos de infecções em humanos e em animais (LUTFUL KABIR, 2010). As enfermidades ocasionadas por *Salmonella* e veiculadas por alimentos são consideradas um dos mais graves problemas de saúde pública (CARDOSO & CARVALHO, 2006). Os trabalhadores das granjas podem carrear *Salmonella* de uma unidade para outra por meio de roupas, calçados e mãos contaminadas, infectando as aves em produção (WRAY et al, 1998). Marin et al (2011) isolaram *Salmonella* em 19,7% de 61 suabes de botas de trabalhadores de granjas na Espanha. No Brasil, estudos verificaram a presença de *Salmonella* em carcaças de frangos e em seus subprodutos. Hall et al (2009) coletaram 50 amostras de carne de frango crua em nove estabelecimentos comerciais de Botucatu-SP e 8% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella*. Borsoi et al (2010) isolaram *Salmonella* em 12,2% de 180 carcaças de frango coletadas no Rio Grande do Sul. Também no RS, Tejada et al (2013) isolaram *Salmonella* de fezes de frango (4/200) e produtos de frango (8/200), em 40 aviários.

*Campylobacter* desempenha um papel notável no contexto de doenças humanas provocadas pelo consumo de alimentos contaminados, sendo as principais

espécies envolvidas *C. jejuni* e *C.coli* (TEE et al, 1987). Estas espécies são componentes da microbiota intestinal de animais domésticos e silvestres, disseminam-se pelo meio ambiente e contaminam a água, as pastagens e as culturas vegetais (HUNT et al, 2001). As aves são portadoras assintomáticas, podendo excretar  $10^4$  a  $10^8$  células de *Campylobacter* spp. por grama de fezes (FRANCHIN et al, 2005). A contaminação da carcaça e das vísceras pode ocorrer por meio de manipulação e operações de abate sem a observação de práticas higiênicas (CARVALHO & COSTA, 1996). Os processos de escaldagem, depenagem e resfriamento têm sido apontados como os pontos de maior risco de contaminação (MADALOZZO et al, 2007).

O gênero *Yersinia* compreende bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, resistentes ao congelamento, mas sensíveis ao calor (BOTTONE et al, 2005). Este grupo compreende 12 espécies, mas apenas três são de importância médica: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, sendo a última mais prevalente em humanos (MERHEJ et al, 2008). *Y. enterocolitica* é transmitida ao homem através da água e alimentos e costuma causar uma síndrome gastroentérica (SULAKVELIDZE, 2000).

A produção segura de carne de frango envolve o controle sanitário de todos os segmentos do sistema produtivo. O monitoramento destes agentes é complexo, pois envolve diversas fontes potenciais de contaminação, como incubatório, ambiente de produção, abatedouro, animais silvestres e domésticos, falhas na biossegurança, manejo, instalações e alimentos (MOREIRA et al, 2008).

Nos últimos anos, tem-se investigado a participação das aves silvestres na cadeia epidemiológica de enfermidades com potencial zoonótico (SILVA, 2004). As aves silvestres, especialmente aquáticas e migratórias, são consideradas portadoras e/ou reservatórios de diversos patógenos, podendo desempenhar importante papel como disseminadores. Elas podem se infectar pela ingestão de presas doentes ou por contaminação oral-fecal (TIZARD, 2004) e também podem disseminar bactérias através de suas patas (WRAY et al, 1998). Gopee et al (2000) analisaram 435 amostras de soros de aves aquáticas, aves de rapina e psitacídeos, e identificaram 3% delas como positivas para *Salmonella* spp.. *C. jejuni* e *C. coli* foram isolados de bovinos de leite que se alimentavam em comedouros com livre acesso de aves silvestres (WESLEY et al, 2000), sugerindo que estas podem ter transmitido a bactéria aos bovinos após contaminarem os comedouros onde a alimentação era

fornecida. Porém, a maioria dos relatos disponíveis refere-se a aves silvestres oriundas de cativeiros e tráfico animal. Normalmente, após a apreensão, os animais acabam permanecendo em núcleos de reabilitação ou centros de triagem, onde são submetidos a diversos exames de avaliação, gerando dados de interesse epidemiológico (GONÇALVES et al, 2013; MOURA et al, 2012; SANTOS et al, 2010).

A contaminação dos produtos de frango por patógenos capazes de causar DTA em humanos através do seu consumo pode ter origem nos aviários. Portanto, considerando a hipótese de que as aves silvestres podem contaminar os frangos em produção e ser contaminadas por estes, esse estudo teve como objetivo geral relacionar isolados de *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica* obtidos de frangos e de aves silvestres capturadas no entorno dos aviários. Os objetivos específicos foram verificar e relacionar quais espécies de aves silvestres circulam na região e podem albergar *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica*, identificar os genes *cdt* nos isolados de *Campylobacter* e verificar quais sorotipos de *Salmonella* encontrados.

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

**Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) de vida livre**

**Priscila Alves Dias, Daiane Elisa Wilsmann, Júlia Grün Heinen, Carine Dahl Corsini, Cecília Calabuig, Cláudio Dias Timm  
Submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz**

**Primeiro relato de *Salmonella entérica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) de vida livre**

The first report of *Salmonella enterica* and *Campylobacter* spp. isolated from Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) and Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) living wild

Priscila Alves DIAS<sup>1\*</sup>, Daiane Elisa WILSMANN<sup>1</sup>, Júlia Grün HEINEN<sup>1</sup>, Carine Dahl CORSINI<sup>2</sup>, Cecília CALABUIG<sup>3</sup>, Cláudio Dias TIMM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA

\* Autor para correspondência: Priscila Alves Dias

E-mail: [dias.alvespri@gmail.com](mailto:dias.alvespri@gmail.com) Fone: (53)99118046

Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Capão do Leão, prédio 34, (53)32757561. Pelotas-RS CEP: 96010900, Brasil

**RESUMO**

Algumas espécies de aves silvestres têm sido identificadas como reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*, atuando como propagadoras desses micro-organismos, entretanto, no Brasil, não há estudo sobre o papel das aves silvestres na transmissão desses patógenos. O trabalho teve como objetivo verificar a presença desses patógenos em aves silvestres que alimentam-se em lavouras orizícolas. Foram capturados com redes de neblina 23 Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*), uma Rolinha-picuí (*Columbina picui*) e um Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*). Amostras de fezes foram coletadas com uso de zaragatoas e processadas para pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Salmonella enterica*. Oito (32%) amostras de fezes de *C. ruficapillus* foram positivas para *Campylobacter* e seis (24%),

cinco de *C. ruficapillus* e uma de *S. flaveola*, para *Salmonella*. O estudo demonstrou que *C. ruficapillus* e *S. flaveola* são reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*, e podem, conseqüentemente, ser potenciais disseminadores destes patógenos. Este é o primeiro registro de isolamento de *Campylobacter* e *Salmonella* de *C. ruficapillus* e *S. flaveola* silvestres.

**Palavras-chaves.** aves silvestres, orizicultura, *Salmonella*, *Campylobacter*

## ABSTRACT

Some species of wild birds have been identified as reservoirs of *Campylobacter* and *Salmonella*, acting as disseminators of these microorganisms, however, in Brazil, there is no study on the role of wild birds in the transmission of these pathogens. The study aimed to verify the presence of these pathogens in wild birds that feed on rice pads. Were captured with mist nets 23 Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*), one rolinha-picuí (*Columbina picui*) and one Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*). Stool samples were collected using swabs and processed to search for *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica*. Eight (32%) fecal samples taken from *C. ruficapillus* were positive to *Campylobacter* and six (24%) were positive to *Salmonella enterica*; five (20%) taken from *C. ruficapillus* samples and one (4%) taken from *S. flaveola* were positive to *Salmonella enterica*, showing that two bird species are reservoirary and potentially spread these microorganisms. The study demonstrated that *C. ruficapillus* and *S. flaveola* are reservoirs of *Campylobacter* and *Salmonella*, therefore can be potential transmitters of these pathogens. This is the first report of isolation of *Campylobacter* and *Salmonella* from *C. ruficapillus* and *S. flaveola* living wild.

**Keywords.** wild birds, rice crops, *Salmonella*, *Campylobacter*

## INTRODUÇÃO

*Campylobacter* e *Salmonella* são importantes patógenos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, transmitidos principalmente por produtos avícolas. *Campylobacter* é essencialmente apatogênico para as aves, tornando-as potenciais

transmissoras deste patógeno<sup>1</sup>. A maior parte das campylobacterioses humanas provém de alimentos contaminados, porém outras vias de infecções ainda devem ser estudadas. Bactérias do gênero *Salmonella* têm sido isoladas de diversos alimentos e responsabilizadas por surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos<sup>2</sup>. No Brasil, *Salmonella* foi o principal agente etiológico identificado em 8.663 casos de surtos de DTA notificados ao Ministério da Saúde entre 2000 e 2011<sup>3</sup>.

As aves silvestres são consideradas reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella* e, devido à sua grande mobilidade, podem atuar como propagadoras de micro-organismos patogênicos para aves domésticas utilizadas para consumo humano, através da contaminação direta ou de alimentos e água<sup>4,5</sup>. Os humanos estão expostos a fezes contaminadas de animais domésticos e silvestres durante atividades ao ar livre, como caminhadas, acampamentos e piqueniques. Também pode ocorrer contaminação indireta via fômites, como sapatos e roupas<sup>6</sup>.

As lavouras de arroz da região sul do Brasil criaram um sistema de áreas úmidas sazonais de estrutura e dinâmica previsíveis, das quais algumas espécies de aves se beneficiaram, explorando os recursos existentes nesses banhados artificiais<sup>7</sup>. Estas aves estão em contato muito próximo com os seres humanos e podem contaminar com suas fezes as aguadas e os silos de armazenamento de grãos de arroz. Além disso, os animais domésticos em contato com fezes de aves contaminadas podem passar a albergar os patógenos e veiculá-los para os humanos.

Em animais de produção o estudo sobre micro-organismos patogênicos é bastante difundido, pois apresentam impacto sobre a economia, porém a microbiota de aves silvestres tem sido pouco estudada, há poucos trabalhos sobre a ocorrência de bactérias de importância em saúde pública, particularmente no Brasil, sendo a maioria realizados com animais oriundos do tráfico e/ou cativo. Considerando a escassez de informações quanto à

ocorrência de micro-organismos patogênicos nas aves silvestres, ou seja, de vida livre, que utilizam as lavouras orizícolas para descanso, alimentação e/ou reprodução, o trabalho teve como objetivo verificar a presença de *Samonella* e *Campylobacter* nessas aves.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram capturadas 25 pequenas aves silvestres próximo a lavouras de arroz na região sul do Rio Grande do Sul. Para a captura das aves, foram utilizadas quatro redes de neblina de 12 metros. As aves foram identificadas em gênero e espécie de acordo com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO)<sup>8</sup>.

Foram coletadas amostras de fezes da região da cloaca com o uso de zaragoas estéreis, as quais foram mantidas em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente encaminhadas ao laboratório. Após a coleta, as aves foram soltas.

Para o isolamento de *Campylobacter*, o material das zaragoas foi diretamente semeado na superfície de ágar Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, Michigan). A incubação foi feita a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia. O meio foi adicionado de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento antioxidante FBP (Piruvato de sódio, Bissulfato de sódio, Sulfato de ferro)<sup>9</sup> e 1% (m/v) de mistura de antibióticos Campilofar® (Vancomicina 2,9 mg; Anfotericina B 5,8 mg; Cefalotina 4,35 mg; Polimixina B 725UI; Trimetoprim 1,45 mg; Cefar Diagnóstica LTDA, São Paulo, Brasil) para inibir o desenvolvimento da microbiota acompanhante. A atmosfera de microaerofilia foi gerada através de uma modificação sugerida por Filgueiras & Hofer<sup>10</sup> da técnica de passivação do cobre descrita por Attebery & Finegold<sup>11</sup>. Adaptada proporcionalmente a uma jarra de 2,5 L, esta técnica consiste em triturar 2,8 g de Sonrisal (Sanofi-Winthrop Farmacêutica), colocar em uma base de placa de Petri e, sobre este, colocar 7,1 g de palha de

aço (Bombril<sup>®</sup>) embebida em solução acidulada de sulfato de cobre. Com este preparo, obtêm-se uma concentração final de 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub>.

As colônias típicas, com brilho d'água e espraiadas, foram coradas pela técnica de coloração de Gram e observadas em microscópio ótico. Os isolados com morfologia de bastonetes delgados, em forma de S ou de asa de gaivota foram testados quanto à produção das enzimas catalase e oxidase.

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragatoas foram colocadas em tubos de ensaio com 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia). O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella*, conforme recomendado por U.S. Food and Drug Administration – FDA<sup>12</sup>.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Rio Grande e a captura das aves silvestres foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

## RESULTADOS

Foram capturadas 23 aves da espécie *Chrysomus ruficapillus*, uma *Columbina picui* e uma *Sicalis flaveola*. Oito (32%) amostras de fezes de *C. ruficapillus* foram positivas para *Campylobacter* e seis (24%), cinco de *C. ruficapillus* e uma de *S. flaveola*, para *Salmonella*. Duas aves da espécie *C. ruficapillus* albergavam ambos os micro-organismos.

## DISCUSSÃO

Gonçalves et al.<sup>13</sup> isolaram *Salmonella* de 1,7% (2/117) das aves silvestres estudadas. Embora os autores tenham estudado também animais de vida livre, apenas dois papagaios (*Amazona aestiva*), pertencentes à ordem Psittaciforme, provenientes de cativeiro (tráfico animal), foram positivos para a bactéria. Em estudo semelhante, Lopes et al.<sup>14</sup> também isolaram *Salmonella* (3/182) em Psittaciformes. Santos et al.<sup>15</sup> caracterizando a microbiota cloacal de 51 aves de espécies diferentes da família Cracidae, cativos no RS, não encontrou

*Campylobacter* e *Salmonella*. Em nosso estudo aves positivas pertenciam à ordem Passeriforme e encontravam-se livres na natureza, sendo este o primeiro registro de isolamento de *Campylobacter* e *Salmonella* de *C. ruficapillus* e *S. flaveola* silvestres.

As aves presentes em arrozais do sul do Rio Grande do Sul compreendem uma parcela da avifauna registrada em áreas úmidas da região. Muitas das espécies mais frequentes e abundantes aparentemente se ajustaram ao cultivo do arroz em função de características idiossincráticas resultantes de adaptações para o forrageio em áreas úmidas rasas e esparsamente vegetadas, explorando eficientemente o cultivo e chegando em alguns casos, como o *C. ruficapillus*, a serem considerados pragas agrícolas<sup>7</sup>. O grande número dessas aves nestes ambientes agrícolas, onde toneladas de alimentos são produzidos e estocados, contando com presença permanente de pessoas envolvidas com a atividade, faz com que o contato direto e indireto entre aves e humanos seja bastante intenso.

As aves, ao se alimentarem nas lavouras, defecam sobre as plantas e os grãos que serão colhidos e utilizados na alimentação humana. Os silos, locais onde os grãos de arroz são armazenados após a colheita, podem ser contaminados durante o período em que são abertos para serem abastecidos, quando as aves têm acesso ao seu interior, onde buscam os grãos para se alimentarem. Animais domésticos que entrem em contato com as fezes de aves silvestres portadoras de *Campylobacter* e *Salmonella* podem se contaminar e transmitir os patógenos para o homem e outros animais. Há ainda o risco dos trabalhadores rurais entrarem em contato direto com as fezes contaminadas no exercício das suas atividades.

Este estudo demonstrou que *C. ruficapillus* e *S. flaveola* podem ser reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*, e, conseqüentemente, ser potenciais disseminadores destes patógenos para o ambiente, animais domésticos, o homem e seus alimentos.

## REFERÊNCIAS

1. Germano PML, Germano MIS. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: Germano PML, Germano, MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2ª Edição, Editora Varela, 2003, p. 215-275.
2. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006--2013. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2014;63(15):328-332.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar, 2011. Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar –VEDTHA. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10\\_passos\\_para\\_investigacao\\_surtos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)>.
4. Kapperud G, Rosef O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in Norway. Appl Environ Microbiol, 1983;375-380.
5. Rosef O, Kapperud G, Lauwers S, Gondrosen B. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacterlaridis* from domestic and wild animals. Appl Environ Microbiol, 1985;49(6):1507-1510.
6. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas, ME. Human infection associated with wild birds. J Infec, 2008;56:83-98.
7. Dias RA, Burger MI. A assembléia de aves de áreas úmidas em dois sistemas de cultivo de arroz irrigado no extremo sul do Brasil. Ararajuba, 2005;13(1):63-80.
8. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos [CBRO]. Listas das Aves do Brasil, 10ª ed., 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>.
9. George HA, Hoffmann PS, Krieg NR, Smimbert RM. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol, 1978;8:36-41.
10. Filgueiras ALL, Hofer E. Ocorrência de *Campylobacter* termofilico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. Rev Microbiol, São Paulo, 1989;20:303-308.
11. Attebery HR, Finegold SM. A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. Am J Clin Pathol, 1970;53:383-388.
12. Andrews WH, Jacobson W, Hammack T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, Chapter 5, 2014. Disponível em:<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>.

13. Gonçalves GAM, Almeida SM, Camossi LG, Langoni H, Andreatti Filho RL. Avaliação sorológica de *Parainfluenzavirus* tipo 1, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. *Cienc Anim Bras*, 2013;14(4):473-480.
14. Lopes ES, Cardoso WM, Albuquerque ÁH, Teixeira RSC, Salles RPR, Bezerra WGA, Rocha e Silva RC, Lima SVG, Sales RJPF, Vasconcelos RH. Isolation of *Salmonella* spp. in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2014;66(3):965-968.
15. Santos HF, Flôres ML, Lara VM, Silva MS, Battisti L, Lovato LT. Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. *Pesq Vet Bras*, 2010;30(12):1077-1082.

## 2.2 Artigo2

***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em frangos de corte e aves silvestres capturadas no entorno de aviários**  
**Priscila Alves Dias, Thamiris Pereira de Moraes, Daiane Elisa Wilsmann, Cecilia Calabuig, Cláudio Dias Timm**  
**Irà ser submetido à revista Brazilian Journal of Microbiology**

## ***Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em frangos de corte e aves silvestres capturadas no entorno de aviários**

Dias, P.A; Moraes, T.P.; Wilsmann, D.E.; Calabuig, C.; Timm, C.D.

### **Resumo**

A contaminação dos produtos de frango por patógenos capazes de causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos através do seu consumo pode ter origem nos aviários. Portanto, considerando a hipótese de que as aves silvestres podem contaminar os frangos em produção e ser contaminadas por estes, esse estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* e *S. enterica* em frangos de corte e em aves silvestres capturadas no entorno dos aviários, estabelecendo a relação entre eles, pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados de *Campylobacter* e identificar os sorotipos de *Salmonella* encontrados. Cento e oitenta e nove aves silvestres, de várias espécies, foram capturadas no entorno dos aviários com quatro redes de neblina de 12m com malha de 30mm e esforço de captura de 16h, tiveram amostras de fezes coletadas e foram soltas. Duzentas amostras de fezes de frangos de corte de 10 aviários foram coletadas. As fezes foram obtidas diretamente da cloaca com zaragatoas estéreis e processadas para pesquisa de *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica*. Foram isolados *Campylobacter* spp., *S. enterica* e *Y. enterocolitica* de frangos. Duas espécies de aves silvestres, *Sicalis flaveola* (Canário-da-terra) e *Zonotrichia capensis* (Tico-tico), foram positivas para *Salmonella* e *Campylobacter*, respectivamente. Todos os isolados de *Campylobacter* analisados apresentaram os genes *cdt*. Em dois aviários, *Campylobacter* foi isolado tanto de frangos como de aves silvestres, sugerindo que as aves silvestres e frangos de corte contaminem-se mutuamente com micro-organismos importantes em saúde pública. Este foi o primeiro relato de isolamento de *Campylobacter* em *Z. capensis*.

**Palavras-chave:** patógenos; *Zonotrichia capensis*; *Sicalis flaveola*; genes *cdt*

### **Abstract**

Contamination of chicken products by pathogens capable of causing Foodborne Diseases in humans through consumption may originate in aviaries. Therefore, considering the hypothesis that wild birds can infect chickens in production and be contaminated by these, this study aimed to verify the occurrence of *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* and *S. enterica* in broilers and wild birds captured in the vicinity of aviaries, establishing the relationship between them, search for the presence of genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* isolates of *Campylobacter* in and identify *Salmonella* serotypes found. One hundred and eighty nine wild birds of various species were captured in the vicinity of the aviaries with four 12m mist nets with 30mm mesh and capture effort of 16h, had fecal samples collected and were released. Two hundred stool samples from broilers in 10 aviaries were collected. Feces were obtained directly from the cloaca with sterile swabs and processed for *Campylobacter* research spp., *S. enterica* and *Y. enterocolitica*. Were isolated *Campylobacter* spp., *S. enterica* and *Y. enterocolitica* in broilers. Two species of wild birds, *Sicalis flaveola* (Canary-the-earth) and *Zonotrichia capensis* (Tico-Tico) were positive for *Salmonella* and *Campylobacter*, respectively. In all *Campylobacter* isolates were found the *cdt*

genes. In two aviaries, *Campylobacter* was isolated both broilers and wild birds, suggesting that wild birds and broilers are contaminating each other with important microorganisms in public health. This was the first report of *Campylobacter* isolation in *Z. capensis*.

**Keywords:** pathogens; *Zonotrichia capensis*; *Sicalis flaveola*; *cdt* genes

## Introdução

*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* estão entre os micro-organismos mais comumente associados a toxinfecções alimentares envolvendo o consumo produtos de origem animal (CDC, 2014). A contaminação desses produtos muitas vezes tem origem nos aviários (SILVA & DUARTE, 2002). Devido ao sistema intensivo de produção, o hábito coprofágico e a facilidade com que os patógenos colonizam o intestino dos frangos, a disseminação horizontal ocorre rapidamente dentro dos lotes. A contaminação pode persistir até o abate, caso medidas higiênico-sanitárias adequadas não sejam adotadas, contribuindo para que os produtos de frango sejam a principal fonte de contaminação para os humanos (CALIL et al, 2008).

A salmonelose é uma DTA comumente associada ao consumo da carne de frango. A importância da *Salmonella* em saúde pública decorre da alta ocorrência mundial do micro-organismo em frangos de corte (D'AOUST, 2001). A prevalência em carne de frango e derivados é bastante variável, havendo trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil que relatam valores de até 50% (REZENDE et al, 2005; RIBEIRO et al, 2007; SANTOS et al, 2000; SILVA et al, 2004).

Nos Estados Unidos, *C. jejuni* é o segundo agente mais frequentemente associado à diarreias bacterianas, sendo superado apenas por *Salmonella* (CDC, 2014). Além da infecção entérica, *C. jejuni* pode causar a síndrome de Guillain-Barré, uma enfermidade grave que cursa com paralisia neuromuscular aguda, cuja ocorrência é calculada em um para cada 1000 casos de campylobacteriose (ALTEKRUSE et al, 1999). Prevalências de 24% a 60% de *Campylobacter* em carcaças de frango têm sido encontradas em diferentes estados brasileiros (AQUINO et al, 2002; MODOLO et al, 2005). Diferentemente de *Salmonella*, *Campylobacter* é essencialmente não patogênico para as aves, não representando um problema para os sistemas de produção avícola, o que faz com que seu controle seja negligenciado nos aviários (GERMANO & GERMANO, 2003).

O gênero *Yersinia* compreende mais de 10 espécies, sendo três delas potencialmente patogênicas, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* (MERHEJ et al, 2008). O homem pode desenvolver yersiniose através do contato direto com animais infectados, como roedores, aves, e suínos, ou pela ingestão de água e alimentos contaminados com a bactéria (FRANCO & LANDGRAF, 2003). *Yersinia enterocolitica*, principal espécie de importância em alimentos, tem sido considerada um patógeno emergente. Sua incidência, em alguns países, como agente causador de diarreia, é equivalente a de *Salmonella* e *Campylobacter* (EFSA, 2012).

De acordo com Bailey (1993), as principais fontes de contaminação dos frangos por patógenos são a ração contaminada, a transmissão horizontal e o ambiente de criação contaminado, incluindo também roedores, insetos, aves silvestres, animais domésticos e o homem. As aves silvestres são consideradas reservatórios de *Campylobacter* (ROSEF et al, 1985) e *Salmonella* (KAPPERUD & ROSEF, 1983) e, devido a sua alta mobilidade, podem atuar como veiculadoras desses micro-organismos para os frangos. O acesso destes vetores ao aviário pode contaminar a água dos bebedouros, a ração e a cama sobre a qual os frangos vivem. Uma vez no ambiente de produção, os patógenos podem ser levados com os frangos nas penas, na pele, nas patas e nas fezes e, posteriormente, contaminar a carne, durante o abate e o processamento das carcaças (HALD et al, 2004).

A ocorrência de clones de *Campylobacter* em animais, alimentos e humanos tem sido reportada em outros países e regiões (RAGIMBEAU et al, 2008; ZORMAN et al, 2006). No Brasil, faltam estudos que permitam conhecer a dinâmica da epidemiologia da campylobacteriose na cadeia alimentar, o que constitui a base indispensável para traçar planos efetivos de controle da enfermidade.

Um dos fatores de patogenicidade da bactéria, responsável pelos sinais clínicos em humanos, é a toxina citoletal distensiva (CDT). Essa toxina é composta pelas subunidades protéicas cdtA, cdtB e cdtC, codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente. É necessária a expressão dos três genes para que a proteína esteja na sua forma ativa e possa penetrar nas células. A subunidade cdtB é o componente tóxico, que atua como uma DNase. CdtB chega até o núcleo da célula intestinal e leva à quebra da fita dupla de DNA, provocando a morte celular. As funções das porções cdtA e cdtC ainda não são claras, mas parece serem responsáveis pela ligação a receptores celulares e endocitose. Mutações nos genes

*cdt* podem causar perda de função, impedindo, desta forma, que ocorram os danos celulares (YOUNG et al, 2007).

Com o intuito de esclarecer questões sobre a interação entre as espécies de aves silvestres e aves em produção, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* e *S. enterica* em frangos de corte e em aves silvestres capturadas no entorno dos aviários, estabelecendo a relação entre eles, pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados de *Campylobacter* e identificar os sorotipos de *Salmonella* encontrados.

## **Material e Métodos**

### **Coleta das amostras**

Foram acompanhados 10 lotes de frango de diferentes aviários da região sul do Estado do Rio Grande do Sul, que trabalham com galpões com lotação entre 5.200 e 5.400 frangos (10 aves/m<sup>2</sup>). De cada aviário, foram coletadas 20 amostras de fezes de frangos um dia antes do embarque para abate e amostras de fezes de aves silvestres capturadas próximas ao galpão durante o período de permanência do lote. Para a coleta de fezes de aves silvestres de diferentes espécies passíveis de captura, quatro redes de neblina de 12m com malha de 30mm foram colocadas em locais estratégicos no entorno dos aviários. As redes permaneceram abertas durante 4 períodos (2 manhãs e 2 tardes) de 4h, totalizando 16h, sendo revisadas em intervalos de tempo não superiores a 30min. Todas as aves capturadas nas redes tiveram amostras de fezes coletadas diretamente da cloaca com uso de zaragatoas estéreis. Após, as aves silvestres foram identificadas taxonomicamente quanto ao gênero e espécie, de acordo com a Lista das Aves do Brasil, do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2011), anilhadas com anilhas fornecidas pelo CEMAVE e soltas imediatamente. As amostras de fezes foram encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), em caixas isotérmicas com gelo.

### **Obtenção dos isolados**

O isolamento de *Campylobacter* foi realizado conforme descrito por Silva et al (2014). As zaragatoas com as amostras de fezes foram diretamente semeadas em superfície de Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, Michigan) adicionado

de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio piruvato de sódio, bissulfato de sódio, sulfato de ferro – FBP (GEORGE et al, 1978) e 1% (m/v) de mistura de antibióticos Campilofar® (vancomicina 2,9mg; anfotericina B 5,8mg; cefalotina 4,35mg; polimixina B 725UI; trimetoprim 1,45mg; Cefar Diagnóstica LTDA, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 42°C por 48 h em atmosfera de microaerofilia (85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). As colônias típicas, com brilho d'água e espreiadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. As colônias com morfologia típicas de bastonetes delgados, em forma de S ou asa de gaivota foram testadas para a presença das enzimas catalase e oxidase. Os isolados catalase e oxidase positivas foram analisados pela PCR para identificação da espécie e criopreservados em meio estoque constituído por 1mL de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Invitrogen), 1mL de glicerol e 8mL de caldo Muller Hinton (Himedia, Índia), para serem recuperados quando necessário.

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragoas foram colocadas em tubos de ensaio com 10mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia). O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Campylobacter*, conforme recomendado por U.S. Food and Drug Administration – FDA (ANDREWS et al, 2014). A manutenção das culturas dos isolados foi feita do mesmo modo descrito para *Salmonella*.

Para pesquisa de *Y. enterocolitica* foi realizada semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) com a utilização da zaragoa previamente obtida. Após incubação a 37°C por 24h, três colônias lactose negativas foram analisadas pela PCR para identificação da espécie e semeadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia). Após incubação a 37°C por 24h, foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70°C, e recuperados em BHI a 37°C por 24h, quando necessário.

### **Extração de DNA**

O DNA dos isolados suspeitos de *Campylobacter* e de *Y. enterocolitica* (isolados lactose negativa obtidos em ágar MacConkey) foram extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, um *pellet* de colônias obtido diretamente das placas com as culturas foi ressuspensionado em 100µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2M, NaCl 0,5M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01M, pH 7,6]. Foram adicionados 50µL de pérolas de vidro e 100µL de fenol/clorofórmio. Após

homogeneização por 1min, a mistura foi centrifugada a 13.000g por 5min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5M a -70 °C por 30min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000g por 20min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4), foi adicionado 1µL de RNase (10µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

### Identificação da espécie de *Campylobacter*

O DNA dos isolados suspeitos de *Campylobacter* foi analisado através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, de acordo com protocolo descrito por Harmon et al (1997). Foram utilizados dois pares de *primers* (Tabela 1). O par I (pg 3 e pg 50) amplifica uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*. O par II (C-1 e C-4) amplifica uma região específica somente presente em *C. jejuni*. Cada reação teve um volume final de 25µL. Foram utilizados 12µL de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2µL (20pmol) de cada *primer*, 1µL de DNA (na concentração de 5nmol/µL) e 4µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 4min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 45°C por 1min, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 7min. Como controles positivos, foram utilizadas as cepas *C. jejuni* ATCC33291 e *C. coli* CCAMP1003, gentilmente cedida pelo setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. A eletroforese dos produtos da PCR corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) foi realizada em gel de agarose a 1,5%.

**Tabela 1.** *Primers* usados na diferenciação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	Espécie	Tamanho da amplificação na PCR (pb)
Pg 3	GAACCTGAACCGATTTG	<i>C. coli</i>	460
Pg 50	ATGGGATTTTCGTATTAAC	<i>C. jejuni</i>	460
C-1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	<i>C. jejuni</i>	160
C-4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT		

### Identificação dos genes *cdt* de *Campylobacter*

Após a identificação da espécie, foi feita a pesquisa de genes que codificam para fatores de virulência através da técnica de multiplex PCR, de acordo com Martinez et al (2006), utilizando *primers* específicos para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (Tabela 2). Para um volume final de 25µL, foram utilizados 12µL de Master Mix, 2µL (20pmol) de cada *primer* e 1µL (5nmol/µL) de DNA. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 57°C por 1min, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min. Para análise do produto amplificado, foi utilizada a mesma técnica já descrita anteriormente.

**Tabela 2.** *Primers* usados na pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	Tamanho da amplificação na PCR (pb)
<i>cdtA</i> -F	CTATTACTCCTATTACCCCACC	422
<i>cdtA</i> -R	AATTTGAACCGCTGTATTGCTC	
<i>cdtB</i> -F	AGGAACTTTACCAAGAACAGCC	531
<i>cdtB</i> -R	GGTGGAGTATAGTTTTGTTGTC	
<i>cdtC</i> -F	ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG	339
<i>cdtC</i> -R	CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC	

### Identificação de *Y. enterocolitica*

Foi realizada duplex PCR para identificação de *Y. enterocolitica*, conforme Wannet et al (2001). Cada 25µL da mistura de reação continha os *primers* específicos para o gene *ail* e rRNA 16S (Tabela 3) nas concentrações de 160nM e 80nM, respectivamente; 200µM de cada nucleotídeo; 0,5U de *Taq* DNA polimerase; 1x de tampão; 2µL (20ng) de DNA. A amplificação foi realizada a 94°C durante 5min, seguido por 36 ciclos de 94°C durante 45s, 62°C por 45s e 72°C por 45s. A extensão final foi realizada a 72°C durante 7min. Os produtos de PCR, corados com GelRed, foram visualizados em gel de agarose 1,5% .

**Tabela 3.** *Primers* utilizados na identificação de *Yersinia enterocolitica*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da	Referência
---------------	---------------------	-----------	------------	------------

amplificação (pb)				
A1	TTAATGTGTACGCTGGGAGTG	<i>ail</i>	425	Wannet et al (2001)
A2	GGAGTATTCATATGAAGCGTC			
Y1	AATACCGCATAACGTCTTCG	16S	330	Neubauer et al(2000)
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			

### Sorotipagem de *Salmonella*

Os isolados de *Salmonella* foram encaminhados ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Manguinhos, Rio de Janeiro) para identificação dos sorotipos. A caracterização antigênica foi realizada através da determinação das estruturas somáticas e flagelares, utilizando o processo de soroaglutinação rápida (COSTA & HOFER, 1972). Nessa etapa, foram utilizados antissoros mono e polivalentes somáticos e flagelares produzidos pelo Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz. A representação dos sorovares obedeceu à orientação de Le Minor & Popoff (1987).

### Resultados e Discussão

Foram estudados 10 aviários, dos quais foram amostradas 189 aves silvestres, de 32 diferentes espécies (Tabela 4) e 200 frangos.

**Tabela 4.** Espécies capturadas no entorno dos aviários.

ESPÉCIES		AVIÁRIOS										TOTAL
Nome científico	Nome popular	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Zonotrichia capensis</i>	tico-tico	2	3	3	5	18	3	1	4	1	1	41
<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da-terra	3	0	2	2	7	1	0	25	0	0	40
<i>Columbina picuí</i>	rolinha-picuí	1	4	5	1	0	0	1	4	1	0	17
<i>Furnarius rufus</i>	joão-de-barro	2	2	5	1	0	0	2	1	1	0	14
<i>Columbina talpacoti</i>	rolinha-roxa	5	1	1	0	0	1	0	0	1	0	9
<i>Lanio cucullatus</i>	tico-tico-rei	0	1	0	0	0	2	1	3	0	1	8
<i>Turdus amaurochalinus</i>	sabiá-poca	4	0	0	0	0	2	2	0	0	0	8
<i>Turdus rufiventris</i>	sabiá-laranjeira	1	3	1	1	0	1	0	0	0	0	7
<i>Agelaioides badius</i>	asa-de-telha	1	0	1	0	0	2	2	0	0	0	6
<i>Troglodytes musculus</i>	corruíra	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	6
<i>Elaenia parvirostris</i>	guaracava-de-bico-curto	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0	5

<i>Saltator similis</i>	trinca-ferro	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	3
<i>Molothrus bonariensis</i>	vira-bosta	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Pipraeidea bonariensis</i>	sanhaço-papa-laranja	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>Parula pitayumi</i>	mariquita	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>Passer domesticus</i>	pardal	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
<i>Pitangus sulphuratus</i>	bem-te-vi	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>Camptostoma obsoletum</i>	risadinha	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Chiroxiphia caudata</i>	tangará	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Chloroceryle americana</i>	martim-pescador	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Coereba flaveola</i>	cambacica	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Colaptes melanochloros</i>	pica-pau-verde-barrado	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Basileuterus culicivorus</i>	pula-pula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Guira guira</i>	anu-branco	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Poospiza cabanisi</i>	tico-tico-da-taquara	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Saltator aurantirostris</i>	bico-duro	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Sporophila caeruleascens</i>	coleirinho	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Tachyphonus coronatus</i>	tiê-preto	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Thamnophilus ruficapillus</i>	choca-de-chapéu-vermelho	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Tangara preciosa</i>	saíra-preciosa	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Tangara sayaca</i>	sanhaço-cinzento	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Vireo olivaceus</i>	juruviara	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>		21	19	20	13	28	19	14	43	8	4	<b>189</b>

*Zonotrichia capensis* e *Sicalis flaveola*, foram as espécies mais frequentemente capturadas no nosso estudo, correspondendo a 42,3% das capturas (Tabela 4). Essas espécies, além de serem comuns na área de estudo, têm dieta predominantemente granívora e a disponibilidade de alimento nos aviários deve ter sido fator determinante da sua presença em maior número nos locais de captura. Estas aves são de pequeno porte e, mesmo com o fechamento dos aviários com telas de malha não superior a 2,5cm (BRASIL, 2009) elas conseguem acesso ao interior dos mesmos por pequenas frestas para alimentarem-se da ração fornecida aos frangos. Também foi possível observar a presença de aves silvestres no interior do aviário durante o período de vazio sanitário, quando ocorre o manejo da cama e limpeza de equipamentos. Desse modo, podem contaminar e/ou contaminarem-se com os micro-organismos presentes no ambiente do interior dos aviários.

Todas as aves foram classificadas como residentes ou visitantes comuns no Rio Grande do Sul, segundo a Revisão e Atualização da Lista das Aves do Rio Grande do Sul, Brasil (BENCKE et al, 2010), não constando nenhuma espécie como ameaçada no Estado, conforme a Lista de Referência das Aves do Rio Grande do Sul (BENCKE, 2001).

Foram isolados *Campylobacter* spp. e *S. enterica* de amostras de fezes de frangos e de aves silvestres, e *Y. enterocolitica* apenas de fezes de frangos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Número de aviários, animais amostrados e amostras positivas para *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp.

Aviários	Frangos	Aves silvestres	<i>Y. enterocolitica</i>		<i>S. enterica</i>		<i>Campylobacter</i> spp.	
			Frangos	Aves silvestres	Frangos	Aves silvestres	Frangos	Aves silvestres
1	20	21	2	0	0	0	0	0
2	20	19	0	0	0	0	2	0
3	20	20	0	0	0	1	0	0
4	20	13	2	0	0	0	5	0
5	20	28	0	0	2	0	3	2*
6	20	19	0	0	1	0	0	1*
7	20	14	0	0	0	0	2*	0
8	20	43	0	0	0	0	7*	4/6*
9	20	13	1	0	0	0	0	0
10	20	4	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>189</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>13</b>

\*Amostras analisadas apenas morfológica e bioquimicamente.

Dezoito isolados foram identificados, morfológica e bioquimicamente, como *Campylobacter* spp., conforme recomendado pelo FDA (HUNT et al, 2001), mas devido a dificuldades de cultivo da bactéria não foi possível obter culturas com material suficiente para determinação da espécie pela PCR. *Campylobacter* possui um crescimento fastidioso *in vitro* e pode facilmente perder a capacidade de ser cultivado devido à exposição a condições desfavoráveis (PARK, 2002). O estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, muda a morfologia das células para formas cocoides, entrando em um estado viável não cultivável e sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento (LEE & NEWELL, 2006).

Dos *Campylobacter* isolados de frangos, oito foram identificados como *C. jejuni* e dois como *C. coli*. A presença de *Campylobacter* tem sido reportada em

frangos da região (GOMES et al, 2006; SILVA et al, 2014). Silva et al (2014), também na região do nosso trabalho, isolaram *Campylobacter* de 61/100 amostras de fezes de frangos. Estes resultados são diferentes dos números observados no nosso estudo, 10/200 amostras. Entretanto, Silva et al (2014) trabalharam com 20 aviários, encontrando 17 (85%) deles positivos para *Campylobacter*, ao passo que nós estudamos 10 aviários, dos quais cinco (30%) apresentaram frangos contaminados com a bactéria. Da mesma forma que no nosso trabalho, estes autores identificaram maior ocorrência de *C. jejuni*, 35 (85,4%) isolados, do que de *C. coli*, seis (14,6%) isolados. Gomes et al (2006) também isolaram *C. jejuni* de 21 amostras (5,2%) de fezes de frangos de sete (26,9%) propriedades distintas, voltadas para agricultura familiar. Em outras regiões, as prevalências reportadas têm sido variáveis. Chaves et al (2010), no Pará, e Kuana et al (2008), no Rio Grande do Sul, encontraram 96,6% e 81%, respectivamente, de frangos contaminados em aviários, valores mais elevados dos observados no sul do Rio Grande do Sul. As distintas prevalências podem ser devidas às diferenças no controle higiênico-sanitário de *Campylobacter* adotadas nos aviários. Na Dinamarca, Heuer et al (2001) analisaram as espécies de *Campylobacter* distribuídas em lotes de frangos de corte portadores da bactéria e encontraram 86,2% dos lotes com *C. jejuni*, 10,3% com *C. coli* e 2,5% com infecção mista, proporção de *C. jejuni* e *C. coli* semelhante a encontrada no nosso estudo.

Em dois aviários, foi possível observar a presença de mais de um micro-organismo, concomitantemente. No aviário 4, foram isolados *Campylobacter* e *Yersinia*, e no aviário 5, o mesmo lote foi positivo para *Campylobacter* e *Salmonella*. De acordo com Silva & Duarte (2002), a ocorrência de *Salmonella* em aviários no Brasil é elevada. Tejada (2013), em estudo realizado em 40 aviários localizados na mesma região do nosso estudo, isolou *Salmonella* de 4/200 (2%) amostras de fezes de frangos de três estabelecimentos. Esses valores são iguais aos resultados obtidos por nós, pois, de 200 amostras analisadas, quatro foram positivas.

*Y. enterocolitica* foi isolada de frangos mas não de aves silvestres. O isolamento dessa bactéria de fezes de frangos e outras espécies de aves não tem sido estudado. Castro-Silva et al (2011) analisaram amostras de aves silvestres no litoral de Santa Catarina e não encontraram *Y. enterocolitica*, embora tenham isolado *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* de amostras fecais de *Sula leucogaster*.

As duas espécies encontradas são comuns em roedores, aves e mamíferos, mas não têm importância em alimentos.

Os isolados de *Campylobacter* obtidos de amostras de aves silvestres foram oriundos de uma única espécie, *Z. capensis*, sendo três identificados como *C. coli* e um como *C. jejuni*. Esse é o primeiro registro de isolamento de *Campylobacter* de *Z. capensis*. *Salmonella* foi isolada de uma amostra de fezes coletada de *S. flaveola*. Ao contrário do que ocorre com os animais de produção, os relatos de isolamento de patógenos de origem alimentar em aves silvestres são raros e bastante variáveis quanto aos resultados. Em estudo realizado na Noruega, Refsum et al (2003) isolaram *Salmonella* de 2% de 145 amostras de fezes de aves silvestres. Vlahovic et al (2004) trabalharam na Croácia com 107 aves silvestres de várias espécies e obtiveram dois (1,9%) isolamentos de *C. jejuni* e oito (7,5%) de *Salmonella*, sendo as frequências de isolamento consideradas baixas pelos autores. Com base nos resultados do nosso estudo em relação a esses outros trabalhos, a prevalência de *C. jejuni*, *C. coli*, *Y. enterocolitica* e *S. enterica* em aves silvestres na região pode ser considerada baixa.

Este é o segundo relato de isolamento de *Salmonella* de *S. flaveola* na região sul do Rio Grande do Sul. Dias et al (dados não publicados)<sup>A</sup>, em estudo realizado no extremo sul do Brasil, isolaram *Salmonella* de 6 de 25 (24%) amostras de fezes, cinco de *C. ruficapillus* e uma de *S. flaveola*. Os mesmos autores também isolaram *Campylobacter* de oito (32%) amostras de fezes de *C. ruficapillus*, sendo que duas dessas aves albergavam ambos os micro-organismos. A prevalência de *Salmonella* observada no nosso trabalho pode ser considerada baixa, 0,53% (1/189), quando comparada com a encontrada por Dias et al.

Os aviários que participaram do nosso estudo estão localizados na Serra dos Tapes, onde predominam matas semidecíduas e matagais arbustivos entremeados por áreas abertas de campos herbáceos e matas ripárias. Essa região é geograficamente distinta daquela de terras baixas caracterizada pela orizicultura, onde foi desenvolvido o estudo de Dias et al. Conseqüentemente, apesar de próximas, as duas regiões albergam avifauna um pouco distinta devido às diferenças geográficas, tanto que nenhum exemplar de *C. ruficapillus* foi capturado durante a

---

<sup>A</sup>Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) de vida livre. Dias et al, artigo submetido Revista do Instituto Adolfo Lutz, set/2014.

realização do nosso trabalho. É possível que esta espécie seja um hospedeiro mais frequente dos micro-organismos estudados do que as demais espécies capturadas. O hábito de formarem grandes bandos, fora da época reprodutiva, aumenta a chance de transmissão intra-específica.

Também outros estudos realizados em diferentes países têm apresentado distinta ocorrência de *Salmonella* em aves silvestres. Hughes et al (2008) isolaram 29 *Salmonella* de 32 amostras obtidas a partir de aves silvestres do norte da Inglaterra entre os anos de 2005 e 2006. Por outro lado, Mirzaie et al (2010) isolaram *Salmonella* de apenas 3,8% (18/470) das amostras de vísceras de pardais capturados na região de Teerã, Irã. Essas diferenças provavelmente também estejam relacionadas às espécies envolvidas e ao local onde as aves foram capturadas.

A sorotipificação dos 4 isolados de *Salmonella*, realizada pela FIOCRUZ, demonstrou a presença de S. Anatum, S. Derby e O:3,10. Dos 3 isolados de frangos, 2 pertenciam ao sorotipo S. Anatum. O outro foi identificado somente quanto ao sorogrupo, denominado O:3,10 por não ter sido detectado o antígeno flagelar, porém é possível que pertença ao mesmo sorotipo dos demais frangos, pois Anatum está entre os sorotipos encontrados dentro desse sorogrupo (LE MINOR & POPOFF, 1987). Embora os sorotipos Enteritidis e Typhimurium sejam relatados em outros trabalhos como os mais frequentes em frangos (SURESH et al, 2011; THAKUR, 2013) e em aves silvestres (HUGHES et al, 2008; MIRZAIE et al, 2010), não foi identificado nenhum isolado destes sorotipos no nosso trabalho. Também Tejada (2013), estudando frangos na mesma região, observou maior ocorrência do sorotipo Schwarzengrund, seguido de Mbandaka. Os sorotipos Enteritidis e Typhimurium parecem ser tão frequentes em frangos no sul do Rio grande do Sul como em outros locais.

Todos os isolados de *Campylobacter* apresentaram os genes *cdt* e possuíam os três genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al (2014), que também identificaram a presença dos genes *cdt* em 33/35 (91,7%) isolados de *C. jejuni* de fezes de frango e de produtos de frangos e fezes de humanos. A patogenia da campylobacteriose em humanos não é bem conhecida, mas há uma correlação entre a produção de CDT e casos da doença em humanos, sendo esta toxina um dos fatores de virulência associado às infecções (VAN DEUN et al, 2007). Portanto, embora a capacidade da bactéria provocar doença independa

da produção da toxina, cepas portadoras dos genes *cdt* são capazes de induzir casos mais severos da enfermidade. Em nosso estudo, a identificação desses genes nos isolados significa que as cepas obtidas apresentam um elevado potencial de patogenicidade. Segundo Jain et al (2008), as cepas produtoras de CDT apresentam alto poder de aderência, maior capacidade invasiva e citotoxicidade, o que as torna mais virulentas.

Nos aviários 5 e 8, *Campylobacter* foi isolado tanto de frangos como de aves silvestres. Embora não tenha sido possível realizar a comparação entre essas cepas, de forma a comprovar a sua similaridade, a ocorrência de aves silvestres portadoras de *Campylobacter* no entorno dos aviários, tendo acesso ao ambiente em que se encontravam os frangos, os quais albergavam o mesmo micro-organismo, é sugestivo de que a contaminação entre as aves silvestres e as de produção ocorra. Millán et al (2004) e Bada-Alamedji et al (2006) sugeriram que o contato com aves de vida livre pode ser responsável pela contaminação dos frangos e, conseqüentemente, das suas carcaças. Refsum et al (2002) concluíram, em estudos comparativos de cepas isoladas de aves silvestres, animais domésticos e humanos, que as aves silvestres podem desempenhar um importante papel como fonte de contaminação para humanos e animais domésticos. Kapperud et al (1998) encontraram evidências da transmissão de *S. Typhimurium* de aves silvestres para humanos na Noruega através de investigação epidemiológica de surtos ocorridos entre 1966 e 1996. Alguns autores responsabilizam o homem e seus animais domésticos pela disseminação do patógeno para aves silvestres, através do contato com água poluída por fezes e esgoto sem tratamento (NEWMAN et al, 2007; PENNYCOTT et al, 2006). A disseminação de micro-organismos, segundo Schatzmayr (2001), está associada à urbanização e a pressão demográfica com a expansão da área agrícola, os padrões de comportamento social, o intenso tráfego aéreo que transporta pessoas, animais e produtos, construção de estradas e barragens, bem como a própria migração de aves silvestres. Portanto, é lógico supor que o contato direto ou mesmo indireto de aves silvestres portadoras de micro-organismos patogênicos com frangos de corte leve a contaminação dos mesmos e que o oposto também aconteça. A grande movimentação de aves silvestres, no entorno dos aviários, é fator de risco para a disseminação de agentes zoonóticos, cabendo às autoridades a adoção de programas de educação ambiental e sanitária, voltados à difusão de informações a fim de evitar a contaminação nos aviários.

## Conclusão

A partir dos resultados encontrados, foi comprovado que *S. flaveola* e *Z. capensis* podem ser portadores de *Salmonella* e *Campylobacter*, respectivamente, e que estes micro-organismos, bem como *Y. enterocolitica*, estão presentes em aviários da região sul do estado do Rio Grande do Sul. *S. Derby* e *S. Anatum* foram isoladas de frangos e *S. flaveola*, respectivamente. Todos os isolados de *Campylobacter* apresentaram os genes *cdt*, sendo potencialmente capazes de produzir a toxina CDT.

Fortes indícios de que aves silvestres e frangos de corte contaminem-se mutuamente com micro-organismos importantes em saúde pública foram obtidos nesse estudo. Entretanto, ainda são poucos os dados sobre os micro-organismos albergados por aves silvestres e sobre quais espécies podem ser potenciais transmissoras de patógenos aos animais de produção e ao homem.

## Referências

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 28-35, 1999.

ANDREWS, W. H.; ANDREW, J.; HAMMACK, T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, Chapter 5, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 15 maio 2014.

AQUINO, M. H. C.; PACHECO, A. P. G; FERREIRA, M. C. S.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic campylobacters from animals in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 159-161, 2002.

BADA-ALAMBEDI, R.; FOFANA, A.; SEYDI, M.; AKAKPO A. J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 510-515, 2006.

BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production: a summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v. 72, p. 1169-1173, 1993.

BENCKE, G. A. **Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2001, 104p.

BENCKE, G. A.; DIAS, R. A.; BUGONI, L.; AGNE, C. E.; FONTANA, C. S.; MAURÍCIO, G. N.; MACHADO, D. B. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**, v. 100, n. 4, p. 519-556, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº59, de 04 de dezembro de 2009, que altera a Instrução Normativa nº56, de 04 de dezembro de 2007. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2009.

CALIL, R. M.; SCARCELLI, E.; MODELLI, K. D.; CALIL, E. M. B. **Campilobacterioses: o agente, a doença e a transmissão por alimentos**. São Paulo, 2008, 129p.

CASTRO-SILVA, M. A.; MANOEL, F. C.; KRUEGER, J.; BARREIROS, M. A. B.; BRANCO, J. O. Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 520-524, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006--2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.63, n. 15, p. 328-332, 2014.

CHAVES, S. O. C.; SOUZA, C. O.; FREITAS, J. A.; SANTOS, D. D.; ARAÚJO, C. V.; SILVA, R. R. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouro avícola na mesorregião metropolitana de Belém, PA, BR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 554-560, 2010.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS [CBRO]. **Listas das aves do Brasil**, 10ª ed., 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 02 maio 2014.

COSTA, G. A.; HOFER, E. 1972. Isolamento e Identificação de Enterobactérias. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 120p.

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**. 2th ed. Washington: ASM, 2001.

DIAS, P. A.; WILSMANN, D. E.; HEINEIN, J. G.; CORSINI, C. D.; CALABUIG, C.; TIMM, C. D. Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário da terra (*Sicalis flaveola*) de vida livre. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2014.

EFSA. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **EFSA Journal**. v.10, p.1-442, 2012.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu, 2003, p. 33-81.

GEORGE, H. A.; HOFFMANN, P. S.; KRIEG, N. R.; SMIMBERT, R. M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 8, p. 36-41. 1978.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Ed. 2, Editora Varela, 2003, p. 215-275.

GOMES F. R.; CURCIO B. R.; LADEIRA S. R. L.; FERNÁNDEZ H.; MEIRELES M. C. A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 375-378, 2006.

HALD, B.; SKOVGÅRD, H.; BANG, D. D.; PEDERSEN, K.; DYBDAHL, J.; JESPERSEN J. B.; MADSEN, M. Flies and *Campylobacter* Infection of Broiler Flocks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1490-1492, 2004.

HARMON, K. M; RANSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

HEUER, O. E.; PEDERSEN, K.; ANDERSEN, J. S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and

conventional broiler flocks. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2001.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. **Campylobacter**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm0702616.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

HUGHES, L. A., SHOPLAND, S., WIGLEY, P., BRANDON, H., LEATHERBARROW, H., WILLIAN, N. J., BENNETT, M., PINNA, E., LAWSON, B., CUNNINGHAM, A. A., CHANTREY, J. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005-2006. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 4, 2008.

JAIN, D.; PRASAD, K. N.; SINHA, S.; HUSAIN, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 267-272, 2008.

KAPPERUD, G.; ROSEF, O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 375-380, 1983.

KAPPERUD, G.; STENWIG, H.; LASSEN, J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 Infection in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 8, p. 774-782, 1998.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; BEATRIZ, L.; et al. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LEE, M. D.; NEWELL, D. G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian Diseases**, v. 50, p. 1-9, 2006.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 37:465-468, 1987.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNANDEZ-ASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 45-48, 2006.

MERHEJ, V.; ADÉKAMBI, T.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Yersinia massiliensis* sp. Nov. isolation from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.779-784, 2008.

MILLÁN, J.; ADURIZ G.; MORENO, B.; JUSTE, R. A.; BARRAL, M. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country. **Revue Scientifique et Technique - Office International Des Épizooties**, v. 23, p. 905-911, 2004.

MIRZAIE, S.; HASSANZADEH, M.; ASHRAFI, I. Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 181-186, 2010.

MODOLO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P. A. N.; PADOVANI, C. R.; SIMÕES, L. B.; CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005.

NEWMAN, S. H.; CHMURA A.; CONVERSE K.; KILPATRICK A. M.; PATEL N.; LAMMERS, E.; DASZAK, P. Aquatic bird disease and mortality as an indicator of changing ecosystem health. **Marine Ecology Progress Series**, v.352, p. 299-309, 2007.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.

PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. **Veterinary Record**, v. 158, p. 817-820, 2006.

RAGIMBEAU, C.; SCHNEIDER, F.; LOSCH, S.; MESMO, J.; MOSSONG, J. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* from human, cattle and poultry origins in Luxembourg by multi-locus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fla-short variable region (SVR) typing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7715-7722, 2008.

REFSUM, T.; HEIR, E.; KAPPERUD, G.; VARDUND T.; HOLSTAD, G. Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Determined by Pulsed Field Gel Electrophoresis: Comparison of Isolates from Avian Wildlife,

Domestic Animals, and the Environment in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5600–5606, 2002.

REFSUM, T., VIKØREN, T., HANDELAND, K., KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* Typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 64–72, 2003.  
REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

ROSEF, O.; KAPPERUD, G.; LAUWERS, S.; GONDROSEN, B. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lariidis* from domestic and wild animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1507-1510, 1985.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHATZMAYR, H. G. Viroses emergentes e reemergentes. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 209-213, 2001.

SILVA D. T.; TEJADA T. S.; CUNHA C. C.; LOPES N. A.; AGOSTINETTO A.; COLLARES T.; LEON P. M. M.; TIMM C. D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes cdt. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 297-304, 2014.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, 2002.

SILVA, M. C. D.; RAMALHO, L. S.; FIGUEREDO, E. T. *Salmonella sp.* em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n. 121, p. 80-84, 2004.

SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; HARSHA, H. T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore City of southern India. **Food Research International**, v. 44, n. 3, 2011.

TEJADA, T. S. **Perfis de DNA de *Salmonella spp.* isoladas de produtos de frango e fezes de frango e humanas**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

THAKUR, S.; BRAKE, J.; KEELARA, S.; ZOU, M.; SUSICK, E. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, 2013.

VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M. et al. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal Medical Microbiology**, v.56, p.1284-1289, 2007.

VLAHOVIC, K.; MATICA B.; PAVLAK, I. B. M.; PAVICIC, Z.; NEJEDLI, M. P. S.; DOVC, A. *Campylobacter*, *salmonella* and *chlamydia* in free-living birds of Croatia. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, p. 127-132, 2004.

WANNET, W. J. B; REESSINK, M.; BRUNINGS, H. A.; MAAS, H. M. E.; Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.12, p. 4483-4486, 2001.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews**, v.5, p.665-679, 2007.

ZORMAN, T.; HEYNDRICKX, M.; UZUNOVIĆ-KAMBEROVIĆ, S.; MOŽINA, S. S. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 24-33, 2006.

### 3 Considerações Finais

O estudo da epidemiologia das zoonoses de origem alimentar é essencial para o melhor conhecimento de possíveis fontes de contaminação, estabelecendo-se assim os fatores de risco existentes em determinados ecossistemas, a circulação de agentes entre os animais silvestres e a importância das doenças, servindo de suporte às ações dos serviços veterinários e de saúde pública, com vistas a garantir maior controle higiênico-sanitário sobre os produtos de origem animal.

De acordo com os resultados dos nossos estudos realizados na região sul do Rio Grande do Sul, a presença de micro-organismos patogênicos em *C. ruficapillus*, *S. flaveola* e *Z. capensis* demonstra que esses animais podem ser portadores de *S. enterica* e *Campylobacter* spp., e que estes micro-organismos, bem como *Y. enterocolitica*, estão presentes nos aviários da região. Isso sugere que as aves silvestres devido a sua alta mobilidade podem ser potenciais disseminadores destes patógenos para o ambiente, animais domésticos, o homem e seus alimentos.

## Referências

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 28-35, 1999.

ANDREWS, W. H.; ANDREW, J.; HAMMACK, T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, Chapter 5, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 15 maio 2014.

AQUINO, M. H. C.; PACHECO, A. P. G; FERREIRA, M. C. S.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic campylobacters from animals in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 159-161, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL [ABPA]. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

ATTEBERY, H. R.; FINEGOLD, S. M. A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. **American journal of clinical pathology**, v. 53, p. 383-388, 1970.

BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDI, M.; AKAKPO A. J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 510-515, 2006.

BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production: a summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v. 72, p. 1169-1173, 1993.

BENCKE, G. A. **Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2001, 104p.

BENCKE, G. A.; DIAS, R. A.; BUGONI, L.; AGNE, C. E.; FONTANA, C. S.; MAURÍCIO, G. N.; MACHADO, D. B. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**, v. 100, n. 4, p. 519-556, 2010.

BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Número maisprovável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2338-2342, 2010.

BOTTONE, E. J.; BERCOVIER, H.; MOLLARET, H. H. Genus XLI. *Yersinia*, In: Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer, New York, p.838–848, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria nº193 de 19 de setembro de 1994. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº78, de 03 de novembro de 2003, que institui Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº59, de 04 de dezembro de 2009, que altera a Instrução Normativa nº56, de 04 de dezembro de 2007. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar. **Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – VEDTHA**. 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso: 10 jan. 2015.

CALIL, R. M.; SCARCELLI, E.; MODELLI, K. D.; CALIL, E. M. B. **Campilobacterioses: o agente, a doença e a transmissão por alimentos**. São Paulo, 2008, 129p.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.

CARVALHO, A. C. F. B.; COSTA, F. N. Ocorrência de *Campylobacter* sp em carcaçase cortes de frango ao nível industrial e comercial. **Revista Higiene Alimentar**, v.10, p.41-43, 1996.

CASTRO-SILVA, M. A.; MANOEL, F. C.; KRUEGER, J.; BARREIROS, M. A. B.; BRANCO, J. O. Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 520-524, 2011.

CENTERS FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006--2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.63, n. 15, p. 328-332, 2014.

CENTERS FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), **Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED)**, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

CHAVES, S. O. C.; SOUZA, C. O.; FREITAS, J. A.; SANTOS, D. D.; ARAÚJO, C. V.; SILVA, R. R. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouro avícola na mesorregião metropolitana de Belém, PA, BR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 554-560, 2010.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS [CBRO]. **Listas das Aves do Brasil**, 10ª ed., 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em 02 maio 2015.

COSTA, G. A.; HOFER, E. 1972. Isolamento e Identificação de Enterobactérias. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 120p.

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**. 2th ed. Washington: ASM, 2001.

DIAS, P. A.; WILSMANN, D. E.; HEINEIN, J. G.; CORSINI, C. D.; CALABUIG. C.; TIMM, C. D. Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário da terra (*Sicalis flaveola*) silvestres. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2014.

DIAS, R. A.; BURGER, M. I. A assembléia de aves de áreas úmidas em dois sistemas de cultivo de arroz irrigado no extremo sul do Brasil. **Ararajuba**, v. 13, n.1, p. 63-80, 2005.

EFSA. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **EFSA Journal**. v.10, p.1-442, 2012.

FILGUEIRAS, A. L. L.; HOFER, E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. **Revista de Microbiologia**, v.20, p. 303-308, 1989.

FRANCHIN, P. R., AIDOO, K. E., BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 157-162, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu, 2003, p. 33-81.

GEORGE, H. A.; HOFFMANN, P. S.; KRIEG, N. R.; SMIMBERT, R. M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 36-41, 1978.

GERMANO P. M. L.; GERMANO M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: Germano P. M. L., Germano, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ª Edição, Editora Varela, 2003, p. 215-275.

GOMES, F. R.; CURCIO, B. R.; LADEIRA, S. R. L.; FERNÁNDEZ, H.; MEIRELES, M. C. A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 375-378, 2006.

GONÇALVES, G. A. M.; ALMEIDA, S. M.; CAMOSSO, L. G.; LANGONI, H.; ANDREATTI FILHO, R. L. Avaliação sorológica de *Parainfluenzavirus* tipo 1, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n. 4, p. 473-480, 2013.

GOPEE, N. V.; ADESIYUN, A. A.; CAESAR, K. Retrospective and longitudinal study of Salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 36, n. 2, p. 284-293, 2000.

HALD, B.; SKOVGÅRD, H.; BANG, D. D.; PEDERSEN, K.; DYBDAHL, J.; JESPERSEN J. B.; MADSEN, M. Flies and *Campylobacter* Infection of Broiler Flocks. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 10, n. 8, p. 1490-1492, 2004.

HALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e condições sanitárias e frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p.167-174, 2009.

HARMON, K. M; RANSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

HEUER, O. E.; PEDERSEN, K.; ANDERSEN, J. S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2001.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. **Campylobacter**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm0702616.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

HUGHES, L. A.; SHOPLAND, S.; WIGLEY, P.; BRANDON, H.; LEATHERBARROW, H.; WILLIAN, N. J.; BENNETT, M.; PINNA, E.; LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A. A.; CHANTREY, J. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005-2006. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 4, 2008.

JAIN, D.; PRASAD, K. N.; SINHA, S.; HUSAIN, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 267-272, 2008.

KAPPERUD, G.; ROSEF, O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 375-380, 1983.

KAPPERUD, G.; STENWIG, H.; LASSEN, J. Epidemiology of *Salmonella* Typhimurium 0:4-12 Infection in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 8, p. 774-782, 1998.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; BEATRIZ, L.; et al. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LEE, M. D.; NEWELL, D. G. Campylobacter in poultry: filling an ecological niche. **Avian Diseases**, v. 50, p. 1-9, 2006.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 37:465-468, 1987.

LOPES, E. S.; CARDOSO, W. M.; ALBUQUERQUE, Á. H.; TEIXEIRA, R. S. C.; SALLES, R. P. R.; BEZERRA, W. G. A.; ROCHA E SILVA, R. C.; LIMA, S. V. G.; SALES, R. J. P. F.; VASCONCELOS, R. H. Isolation of *Salmonella* spp. in captive *Psittaciformes* from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 965-968, 2014.

LUTFUL KABIR, S.M. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, p. 89-114, 2010.

MADALOZZO, F. R.; KOETZ, P. R.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. Campilobacteriose em humanos e o controle de qualidade em produtos de origem aviária. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n. 153, p.59-63, 2007.  
MARIN, C.; BALASCH, S.; VEGA, S.; LAINEZ, M. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 39-45, 2011.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNANDEZ-ASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 45-48, 2006.

MERHEJ, V.; ADÉKAMBI, T.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Yersinia massiliensis* sp. Nov. isolation from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.779-784, 2008.

MILLÁN, J.; ADURIZ G.; MORENO, B.; JUSTE, R. A.; BARRAL, M. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country. **Revue**

**Scientifique et Technique - Office International Des Épidémiologies**, v. 23, p. 905-911, 2004.

MIRZAEI, S.; HASSANZADEH, M.; ASHRAFI, I. Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 181-186, 2010.

MODOLO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P. A. N.; PADOVANI, C. R.; SIMÕES, L. B.; CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005.

MOREIRA, G. N.; REZENDE, C. S. M.; CARVALHO, R. N.; MESQUITA, S. Q. P.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M. L. T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 62, n. 2, p. 126-130, 2008.

MOURA, S. G.; PESSOA, F. B.; OLIVEIRA, F. F.; LUSTOSA, A. H. M.; SOARES, C. B. Animais silvestres recebidos pelo centro de triagem do Ibama no Piauí no ano de 2011. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15, p. 1750, 2012.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.

NEWMAN, S. H.; CHMURA A.; CONVERSE K.; KILPATRICK A. M.; PATEL N.; LAMMERS, E.; DASZAK, P. Aquatic bird disease and mortality as an indicator of changing ecosystem health. **Marine Ecology Progress Series**, v.352, p. 299-309, 2007.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.

PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. **Veterinary Record**, v. 158, p. 817-820, 2006.

RAGIMBEAU, C.; SCHNEIDER, F.; LOSCH, S.; MESMO, J.; MOSSONG, J. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* from human, cattle and poultry origins in

Luxembourg by multi-locus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fla-short variable region (SVR) typing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7715-7722, 2008.

REFSUM, T.; HEIR, E.; KAPPERUD, G.; VARDUND T.; HOLSTAD, G. Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Determined by Pulsed Field Gel Electrophoresis: Comparison of Isolates from Avian Wildlife, Domestic Animals, and the Environment in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5600–5606, 2002.

REFSUM, T., VIKØREN, T., HANDELAND, K., KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* Typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 64–72, 2003.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; MESQUITA, A. Q.; MINAFRA, C. S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

ROSEF, O.; KAPPERUD, G., LAUWERS, S.; GONDROSEN, B. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lariis* from domestic and wild animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1507-1510, 1985.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SANTOS, H. F.; FLÔRES, M. L.; LARA, V. M.; SÁ E SILVA, M.; BATTISTI, L.; LOVATO, L. T. Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1077-1082, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHATZMAYR, H. G. Vírus emergentes e reemergentes. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 209-213, 2001.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; CUNHA, C. C.; LOPES, N. A.; AGOSTINETTO, A.; COLLARES, T.; LEON, P. M. M.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 297-304, 2014.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, 2002.

SILVA, J. C. R. **Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres**, 2004. Disponível em: <[www.abravas.org.br](http://www.abravas.org.br)>. Acesso em: 10 jan. 2015.

SILVA, M. C. D.; RAMALHO, L. S.; FIGUEREDO, E. T. *Salmonella sp.* em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n. 121, p. 80-84, 2004.

SULAKVELIDZE, A. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 497-513, 2000.

SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; HARSHA, H. T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore City of southern India. **Food Research International**, v. 44, n. 3, 2011.

TEE, W.; ANDERSON, B. N.; ROSS, B. C.; DWYER, B. Atypical *Campylobacters* associated with gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1248-52, 1987.

TEJADA, T. S. **Perfis de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos de frango e fezes de frango e humanas**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

THAKUR, S.; BRAKE, J.; KEELARA, S.; ZOU, M.; SUSICK, E. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, 2013.

TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 50, p. 50-66, 2004.

TSIODRAS, S.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; BAUCHINGER, U.; FALAGAS, M. E. Human infection associated with wild birds. **The Journal of infection**, v. 56, p. 83-98, 2008.

VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M.; FAVOREEL, H.; DEWULF, J.; CELEN, L.; DUMEZ, L.; MESSENS, W.; LELEU, S.; IMMERSEEL, F. V.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p.1284-1289, 2007.

VLAHOVIC, K.; MATICA B.; PAVLAK, I. B. M.; PAVICIC, Z.; NEJEDLI, M. P. S.; DOVC, A. Campylobacter, salmonella and chlamydia in free-living birds of Croatia. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, p. 127-132, 2004.

WANNET, W. J. B; REESSINK, M.; BRUNINGS, H. A.; MAAS, H. M. E. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.12, p. 4483-4486, 2001.

WESLEY, I. V.; WELLS, S. J.; HARMON, K. M.; GREEN, A.; SCHROEDER-TUCKER, L.; GLOVER, M.; SIDDIQUE, I. Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1994–2000, 2000.

WRAY, C.; DAVIES, R. H.; CORKISH, F. D. *Enterobacteriaceae*. In: JORDAN, F. T. W., PATTISON, M. **Poultry Diseases**, 4th edition. Ed. Saunders, London, 1998.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews**, v.5, p. 665-679, 2007.

ZORMAN, T.; HEYNDRICKX, M.; UZUNOVIĆ-KAMBEROVIĆ, S.; MOŽINA, S. S. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina.