



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *MYCOPLASMA SPP.*  
EM PSITACÍDEOS DE DOIS CRIADOUROS DO  
DISTRITO FEDERAL**

**JULIANA PIGOSSI NEVES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA-DF  
MARÇO/2013**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *MYCOPLASMA SPP.*  
EM PSITACÍDEOS DE DOIS CRIADOUROS DO  
DISTRITO FEDERAL**

**JULIANA PIGOSSI NEVES**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL VERÍSSIMO MONTEIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 069/2013**

**BRASÍLIA-DF  
MARÇO/2013**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

NEVES, J. P. **Estudo da prevalência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de dois criadouros do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 75p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado, empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Neves, Juliana Pigossi

Estudo da prevalência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de dois criadouros do Distrito Federal / Juliana Pigossi Neves orientação de Rafael Veríssimo Monteiro - Brasília, 2013. 75p. Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Psitacídeos 2. Doença respiratória 3. *Swab* 4. Microbiota respiratória 5. Micoplasmose aviária 6. PCR I. NEVES, J. P. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *MYCOPLASMA SPP.* EM  
PSITACÍDEOS DE DOIS CRIADOUROS DO DISTRITO FEDERAL**

**JULIANA PIGOSSI NEVES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE ANIMAL COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

**APROVADA POR:**

---

**RAFAEL VERÍSSIMO MONTEIRO (ORIENTADOR)**

Doutorado em Biologia Parasitária

Professor Adjunto UnB - FAV

---

**GIANE REGINA PALUDO (EXAMINADOR INTERNO)**

Doutorado em Patologia Molecular

Professor Adjunto UnB - FAV

---

**MARCELO ISMAR SILVA SANTANA (EXAMINADOR INTERNO)**

Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Professor Adjunto UnB - FAV

**BRASÍLIA-DF, 08 de março de 2013**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas inúmeras oportunidades que me foram dadas e pela criação das criaturas mais incríveis que poderiam existir, os animais, que despertaram em mim a paixão pela medicina veterinária e a vontade de crescer cada dia mais como profissional.

Aos meus pais e meu irmão por entenderem e me apoiarem durante toda a minha vida, em especial durante os últimos anos e dias, incentivando-me a correr atrás dos meus sonhos e a nunca desistir.

Ao Bruno, meu namorado, por permanecer ao meu lado, me entender e me dar suporte emocional durante os momentos mais estressantes.

Às minhas grandes amigas Aline, Luciana, Priscilla, Rafaela, Raíssa e Rayana, obrigada pelo apoio e incentivo, serão sempre parte do meu porto seguro.

Aos meus amigos de trabalho Stela, Ayisa, Dênis, Filipe e Juliana Batista por me ajudarem em cada coleta e cada dia árduo de trabalho, em todas as vezes em que mais precisei.

Aos residentes e funcionários dos laboratórios de Microbiologia Médica, Parasitologia e Patologia Clínica do Hospital Veterinário, e aos estagiários do grupo de animais silvestres Marianne, Rodrigo, Lorena e Kássia pela grande ajuda a mim prestada durante o trabalho.

Ao coordenador e professor Eduardo pela grande ajuda dada durante os dois anos de pesquisa, em especial na reta final quando tanto precisei, e ao professor Marcelo por entender nossas dificuldades e aceitar o nosso convite de última hora.

Ao meu orientador Rafael pelos conhecimentos preciosos me dados e pelas horas de dedicação a mim prestadas, e às professoras Giane e Simone pelo apoio científico e espaço laboratorial a mim destinados.

Ao pessoal do CETAS, Jardim Zoológico de Brasília, Spa Zen, Zoobotânica Abreu e Lima, ao amigo José Mário e ao médico veterinário Fabrício, por me cederem cordialmente o seu tempo e seus animais, para que fosse concluído esse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT .....	XI
CAPÍTULO I.....	1
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	1
<i>REFERENCIAL TEÓRICO</i> .....	2
<i>OBJETIVOS</i> .....	17
<i>REFERÊNCIAS</i> .....	18
CAPÍTULO II.....	25
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	25
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	26
<i>RESULTADOS</i> .....	40
<i>DISCUSSÃO</i> .....	50
<i>CONCLUSÕES</i> .....	56
<i>REFERÊNCIAS</i> .....	57
CAPÍTULO III.....	63
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i> .....	63
ANEXOS .....	64
<i>ANEXO I</i> .....	64
<i>ANEXO II</i> .....	65
<i>ANEXO III</i> .....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies de araras, papagaios, maitacas, maracanãs e de alguns periquitos que ocorrem no Brasil, seus nomes comum e científico, e respectivos <i>status</i> de conservação. ....	4
<b>Tabela 2:</b> Espécies de <i>Acholeplasma</i> , <i>Mycoplasma</i> , e <i>Ureaplasma</i> que já foram isoladas de hospedeiros aviários. ....	9
<b>Tabela 3:</b> Segundo as reações de PCR realizadas na pesquisa: sequência de oligonucleotídeos, fonte consultada, gene amplificado e tamanho dos produtos da amplificação. ....	37
<b>Tabela 4:</b> Relação de todas as espécies, e respectivas quantidades de indivíduos amostradas no presente estudo de acordo com o criadouro de origem.....	41
<b>Tabela 5:</b> Descrição de aspectos referentes aos recintos e avaliação qualitativa sanitária dada aos locais amostrados. ....	41
<b>Tabela 6:</b> Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais amostrados de acordo com o criadouro de origem.....	42
<b>Tabela 7:</b> Relação das leveduras, gêneros e espécies das colônias bacterianas e fúngicas isoladas das amostras de <i>swab</i> traqueais, e suas respectivas prevalências dentro da população amostrada.....	43
<b>Tabela 8:</b> Prevalência dos IICRs dos indivíduos de acordo com o criadouro. ....	44
<b>Tabela 9:</b> Prevalência dos IICRs dos indivíduos de acordo com o sexo. ....	44
<b>Tabela 10:</b> Distribuição dos animais amostrados conforme o sexo dentro dos grupos. ....	46
<b>Tabela 11:</b> Origem, número dentro do grupo de pesquisa, espécie, sexo, peso, condição de carnes, e respectivas amostras dos animais positivos na PCR para detecção de <i>Mycoplasma spp.</i> e IICRs.....	47
<b>Tabela 12:</b> Resultados obtidos no hemograma e dosagens de bioquímicas séricas dos animais 02 e 100 positivos na PCR para detecção de <i>Mycoplasma spp.</i> ....	48
<b>Tabela 13:</b> Resultados obtidos no hemograma e dosagens de bioquímicas séricas dos animais 31, 51 e 64 positivos na PCR para detecção de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Monitoramento da frequência cardíaca com o auxílio do detector vascular veterinário portátil (Arquivo pessoal).....	29
<b>Figura 2:</b> Inspeção de rêmiges e retrizes, como parte da avaliação clínica individual (Arquivo pessoal). ....	30
<b>Figura 3:</b> Colheita de sangue da veia radial-ulnar de <i>Amazona aestiva</i> (Arquivo pessoal).....	32
<b>Figura 4:</b> A - <i>Swab</i> cloacal de <i>Amazona rhodocorytha</i> ; B - <i>Swab</i> orofaríngeo de <i>Amazona rhodocorytha</i> (Arquivo pessoal).....	33
<b>Figura 5:</b> Colheita de material traqueal de <i>Amazona rhodocorytha</i> por meio de <i>swab</i> desenvolvido pelo grupo de pesquisa (Arquivo pessoal). ....	34
<b>Figura 6:</b> <i>Boxplot</i> da variável concentração de albumina sérica quando analisado o IICR como fator. ....	44
<b>Figura 7:</b> Resultado de PCR para sexagem das aves. 1 - Marcador de peso molecular (100bp); 2 - Controle negativo (água miliQ); 3, 9, 13, 14, e 15 - Aves machos (ZZ); 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, e 12 - Aves fêmeas (ZW). Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).....	45
<b>Figura 8:</b> Resultado de PCR para detecção de <i>Mycoplasma spp.</i> ; 1 - Marcador de peso molecular (100bp); 2 - Controle positivo (vacina comercial); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4 - <i>Orthopsittaca manilata</i> (31), 5 - <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (100), 6 - <i>Amazona aestiva</i> (64), 7 - <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (02); 8 - <i>Amazona ochrocephala</i> (51). Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v). ....	47
<b>Figura 9:</b> Resultado de PCR para detecção de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ; 1 - Marcador de peso molecular (100bp); 2 - Controle positivo (vacina comercial); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4, 5, 6, 7 e 8 - Amostras negativas para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> . Gel de agarose a 2,0% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).....	49
<b>Figura 10:</b> Resultado de PCR para detecção de <i>Mycoplasma synoviae</i> ; 1 - Marcador de peso molecular (100bp); 2 - Controle positivo (vacina comercial); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4, 5, 6, 7 e 8 - Amostras negativas para <i>Mycoplasma synoviae</i> . Gel de agarose a 2,0% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v). ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MI	<i>Mycoplasma iowae</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>

## RESUMO

A micoplasmose está entre as causas de maior perda econômica da avicultura comercial moderna mundial. O agente *Mycoplasma spp.* foi relatado em hospedeiros silvestres em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, sendo as espécies *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* as mais envolvidas. Este estudo teve como objetivos: a) verificar a ocorrência de *Mycoplasma spp.*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em psitacídeos de cativeiro do Distrito Federal, Brasil, por meio de reação da polimerase em cadeia (PCR); b) comparar os perfis hematológicos e bioquímicos dos indivíduos infectados com os dos não infectados; c) avaliar se as condições ambientais em que esses são criados poderiam favorecer uma maior infecção; d) comparar a microbiota isolada do trato respiratório inferior dos animais infectados com a dos não infectados, por meio de *swab* traqueal. Foram analisadas 135 amostras de 23 espécies de psitacídeos sul-americanos, aparentemente saudáveis, oriundos de dois criadouros distintos. Os resultados demonstraram a presença de *Mycoplasma spp.* em 3,7% (05/135), sendo nenhum deles positivo para *M. gallisepticum* ou *M. synoviae*. Dos 135 psitacídeos, 120 indivíduos tiveram cultura microbiológica do trato respiratório inferior isolada. Isolaram-se 12 tipos de bactérias, leveduras, e 11 tipos de fungos ambientais. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre machos e fêmeas, e nos parâmetros hematológicos entre animais infectados e não infectados. Porém, ao avaliar, separadamente, os animais positivos para micoplasma, esses apresentaram pelo menos uma alteração em seus exames. Foram encontradas diferenças estatísticas, entre os 2 criadouros, na contagem total de hemácias, na concentrações de hemoglobina, de aspartato aminotransferase e de ácido úrico. A presença de hipoalbuminemia nos indivíduos que apresentaram a maior diversidade de agentes isolados da traqueia também foi diferente estatisticamente. A grande maioria dos animais teve pelo menos um microrganismo isolado de seu trato respiratório inferior sem que apresentasse qualquer sinal clínico de caráter respiratório.

Palavras-chaves: psitacídeos, doença respiratória, *swab*, microbiota respiratória, micoplasmose aviária, PCR.

## ABSTRACT

In modern commercial poultry worldwide, mycoplasmosis is one of the major reasons of economic loss. There are reports of the *Mycoplasma spp* agent in wild hosts all over the world, including in Brazil, where *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* are the most reported species. The study aimed at: a) verifying the occurrence of *Mycoplasma spp.*, specially *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, in parrots in captivity in Federal District, Brazil by polymerase chain reaction (PCR); b) comparing haematological and biochemical profiles of infected and uninfected animals; c) evaluating if the environmental conditions in which they are created could foster greater infection; d) comparing the microflora isolated from the lower respiratory tract of infected and uninfected animals by tracheal swab. There were 135 animals sampled among 23 species of South American parrots. The animals came from two distinct captivities and were apparently healthy. The survey results identified 3.7% (05/135) of *Mycoplasma spp* and none of them were positive for *M. gallisepticum* ou *M. synoviae*. Microbiological culture of lower respiratory tract was isolated from 120 parrots. A total of 12 types of bacteria and yeast, and 11 types of fungus were isolated. There weren't statistical differences in the frequency between males and females, neither in hematology parameters between infected and uninfected animals. When positive animals for mycoplasma were assessed apart, they had at least one change in their exams. There were statistical differences between the captivities in total count of red blood cells, concentration of hemoglobin, of aspartate aminotransferase and of uric acid. The presence of hypoalbuminemia among individuals that had the highest diversity of agents isolated tracheal was statistical different too. The vast majority of animals had at least one microorganism isolated from its lower respiratory tract without presenting any clinical signs of respiratory character.

Keywords: psittacines, respiratory disease, *swab*, respiratory microflora, avian mycoplasmosis, PCR.

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

O número de doenças infecciosas catalogadas, em especial aquelas relacionadas aos animais de vida livre, tem crescido muito nos últimos anos (Sehgal, 2010). As perturbações ambientais causadas pelo homem podem favorecer a dispersão de doenças uma vez que promove adensamentos de populações animais, principalmente pela fragmentação do *habitat*. O adensamento populacional favorece o aumento de disputas intra ou interespecíficas que antes não existiam, gerando estresse e conseqüentemente a queda de imunidade dos indivíduos (Andriolo, 2006). Uma vez parasitados e com a necessidade de se alcançar novos nichos, estes animais tendem a se tornar potenciais carreadores de parasitos para áreas onde ainda não existiam (Rappole e Hubálek, 2003).

Dentre as doenças observadas em aves, a micoplasmose já foi relatada em hospedeiros silvestres em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, onde já foi observada em columbiformes, passeriformes, psitacídeos, e tinamídeos (Andrade, 2012; Duarte et al., 2006; Ferreira, 2012; Gomes et al., 2010, 2012; Marques et al., 2012; Souza, 2007). A micoplasmose está entre as causas de maior perda econômica da avicultura comercial moderna mundial, sendo o *Mycoplasma gallisepticum* a espécie mais patogênica para galinhas e perus. A doença pode ou não estar associada a outros agentes patogênicos, como bactérias e fungos, sendo que quando presente, pode gerar altos custos com medicamentos, redução no

ganho de peso, e na produção de carne e ovos (Kleven, 2008; OIE, 2008). Animais de vida livre, que frequentemente ocupam nichos próximos às criações de aves domésticas, são suspeitos de serem responsáveis pela transmissão dos agentes infecciosos citados (Cavalheiro, 2001; Souza, 2007).

Devido à micoplasmose ter como características não ser uma zoonose e a baixa mortalidade, sendo que a última pode depender de infecções secundárias, a preocupação dada à ela é ainda muito pequena (Cavalheiro, 2001; Murakami et al., 2002). O pouco incentivo financeiro, a não realização de quarentena, inacessibilidade aos testes ou medicação, e a falta de conhecimento sobre a infecção, podem ser a explicação para se ter tão poucos casos relatados em animais silvestres. São necessários maiores estudos para que se conheça mais sobre a ocorrência e a prevalência da doença em vida livre (Cavalheiro, 2001; Gomes et al., 2010).

Com base nestas informações, o presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da ocorrência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de cativeiro de criadouros do Distrito Federal-DF, Brasil, além de analisar os fatores individuais e ambientais relacionados aos mesmos.

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1. ORDEM PSITTACIFORMES**

A Ordem Psittaciformes possui distribuição mundial desde as zonas tropicais do globo às subtropicais e até frias como a Patagônia. Existem cerca de 332 espécies de psitacídeos catalogadas. Devido à América do Sul ter permanecido isolada geograficamente durante muito tempo, as populações de psitacídeos aqui encontradas são bastante homogêneas geneticamente quando comparadas às australianas (Forshaw, 2010; Sick, 1997). A ordem dos Psittaciformes é dividida, por alguns pesquisadores, em 3 grandes famílias: Loriidae (representada pelos lóris), Cacatuidae (pelas cacatuas) e Psittacidae (araras, papagaios, maracanãs, jandaias e periquitos; Godoy, 2006; Guedes e Scherer, 2001).

Na maioria das espécies de psitacídeos conhecidas não há dimorfismo sexual, isto é, diferenças visíveis a olho nu entre indivíduos machos e fêmeas, como em outros grupos de aves. Destarte, são necessárias técnicas de sexagem a partir

do material genético do animal (Godoy, 2006; Quintana et al., 2008; Sick, 1997). Poucos grupos taxonômicos, entre todas as aves, possuem características visualmente tão parecidas e ímpares como os psitacídeos. Algumas delas, comuns a todos os psitacídeos brasileiros, são: bico alto e recurvado com uma cera na base, maxila com grande mobilidade que possibilita movimentos extras que aumentam a potência do bico, língua grossa, mandíbula capaz de fazer movimentos laterais, pés zigodáctilos (primeiro e quarto dedos deslocados para trás e segundo e terceiro para frente), asas compridas e fortes, plumagem curta, dura e colorida, e região perioftálmica aptéria (Forshaw, 2010; Godoy, 2006; Sick, 1997).

Os humanos sempre tiveram grande interesse pelos psitacídeos, fazendo deles animais de companhia (Forshaw, 2010). Este fato é explicado quando leva-se em consideração as características inerentes ao grupo, como por exemplo sua capacidade de imitar sons e de alto aprendizado (Godoy, 2006; Sick, 1997). Segundo a BirdLife International 2008, cerca de 26% das espécies de psitacídeos do mundo estão sob risco de extinção, estando 36 delas muito próximo disso. As principais causas de ameaça ao grupo são: destruição e fragmentação do *habitat* natural, o abate para a confecção de artesanatos, a introdução de espécies exóticas invasoras, e o tráfico ilegal de animais. O desmatamento, a poluição e as mudanças climáticas são as principais causas de destruição e fragmentação de *habitat*, enquanto a introdução de espécies exóticas invasoras pode acarretar em maior competição pelos recursos naturais e podem ser potenciais predadores. O grupo mais focado pelo tráfico ilegal de animais é o dos papagaios, sendo os principais mercados consumidores a Europa e Estados Unidos (Andriolo, 2006; Godoy, 2006; Guedes e Scherer, 2001; RENCTAS, 2001).

O Brasil abriga a maior diversidade mundial de psitacídeos, contando com cerca de 80 espécies. Estas incluem os maiores representantes dos *Psittacidae*, as araras. Esta diversidade foi evidente para os primeiros europeus, que alcunharam o Brasil como "Terra dos Papagaios" (Andriolo, 2006). A lista dos psitacídeos brasileiros está na Tabela 1.

**Tabela 1:** Espécies de araras, papagaios, maitacas, maracanãs e de alguns periquitos que ocorrem no Brasil, seus nomes comum e científico, e respectivos *status* de conservação.

<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Status</b>
Arara Azul Grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	EP
Arara Azul Pequena	<i>Anodorhynchus glaucus</i>	EX
Arara Azul de Lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	CE
Ararinha Azul	<i>Cyanopsitta spixii</i>	EN
Arara Canindé	<i>Ara ararauna</i>	MP
Araracanga	<i>Ara macao</i>	MP
Arara Vermelha Grande	<i>Ara chloropterus</i>	MP
Papagaio Galego	<i>Alipiopsitta xanthops</i>	VU
Maitaca de Cabeça Azul	<i>Pionus menstruus</i>	MP
Maitaca Verde	<i>Pionus maximiliani</i>	MP
Maitaca Roxa	<i>Pionus fuscus</i>	MP
Papagaio da Várzea	<i>Amazona festiva</i>	MP
Papagaio do Peito Roxo	<i>Amazona vinacea</i>	EP
Papagaio Charão	<i>Amazona pretrei</i>	VU
Papagaio dos Garbes	<i>Amazona kawalli</i>	MP
Papagaio Moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	MP
Papagaio de Cara Roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	EP
Curica	<i>Amazona amazonica</i>	MP
Papagaio Diadema	<i>Amazona autumnalis</i>	MP
Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	EP
Papagaio Campeiro	<i>Amazona ochrocephala</i>	MP
Papagaio Verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	MP
Anacã	<i>Deroptryus accipitrinus</i>	MP
Ararajuba	<i>Guarouba guarouba</i>	EP
Maracanã Guaçu	<i>Ara severus</i>	MP
Maracanã do Buriti	<i>Orthopsittaca manilata</i>	MP
Maracanã Verdadeira	<i>Primolius maracana</i>	MP
Maracanã de Cabeça Azul	<i>Primolius couloni</i>	MP
Maitaca de Colar	<i>Pionus auricollis</i>	MP
Maracanã Pequena	<i>Diopsittaca nobilis</i>	MP
Aratinga da Testa Azul	<i>Aratinga acuticaudata</i>	MP
Periquitão Maracanã	<i>Aratinga leucophthalma</i>	MP
Periquito de Cabeça Preta	<i>Aratinga nenday</i>	MP
Jandaia de Testa Vermelha	<i>Aratinga aricapillus</i>	VU
Jandaia Verdadeira	<i>Aratinga jandaya</i>	MP
Jandaia Amarela	<i>Aratinga solstitialis</i>	MP
Cacaué	<i>Aratinga maculata</i>	MP
Periquito de Cabeça Suja	<i>Aratinga weddellii</i>	MP
Periquito Rei	<i>Aratinga aurea</i>	MP
Periquito da Bochecha Parda	<i>Aratinga pertinax</i>	MP
Periquito da Caatinga	<i>Aratinga cactorum</i>	MP

Legendas: MP - Menor Preocupação; VU - Vulnerável; EP - Em Perigo; CE - Criticamente em Perigo; EN - Extinto na Natureza; EX - Extinta. Fonte: CBRO, 2010; IUCN, 2004; MMA, 2003; UNEP-WCM, 2013 (modificados).

## 2. DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM AVES

Sinais clínicos de caráter respiratório são queixas frequentes relatadas pelos proprietários das aves, sendo que a maior parte das doenças respiratórias conhecidas são de rápido curso, necessitando que haja a intervenção médica o mais

rápido possível para se obter sucesso no diagnóstico e tratamento (Harrison e Tully, 1994). O diagnóstico correto, muitas das vezes, é dificultado quando se leva em consideração as diferenças anatômicas e fisiológicas das aves quando comparadas ao dos mamíferos (Castro, 2000). Outro fato importante para a dificuldade no diagnóstico, é que as aves, assim como outros animais silvestres, disfarçam a magnitude dos sinais clínicos quando doentes, sendo esta uma das formas de adaptação desenvolvida contra a predação quando em vida livre (Samour, 2008). Os sinais clínicos mais comuns de doenças respiratórias observados em aves são: espirros, presença de secreções nasais ou oculares, apatia, e inapetência. Em casos mais graves de dispneia, o animal pode apresentar o balançar de cauda e distensão abdominal ritmados com os ciclos de inspiração e expiração, além de bico aberto, que pode estar apoiado na parede da gaiola (Tully, 1995).

Para um correto diagnóstico das doenças respiratórias, o histórico do animal deve ser somado ao exame físico detalhado, em que são inspecionadas as narinas, cavidade oral, além de palpação das estruturas faciais e auscultação (Samour, 2008). Exames complementares como citologia da coana, lavagem do seio infraorbital com posterior cultura microbiológica e exames de imagem (radiografia) são bastante úteis no diagnóstico de doenças de trato respiratório superior. Quando a suspeita for de afecções do trato respiratório inferior, pode-se fazer o uso de exames de imagem, como a endoscopia associada à coleta de material para cultura microbiológica ou histopatológica, e ainda, lavados e *swabs* traqueais, pulmonares ou de sacos aéreos (Tully, 1995). Técnicas de diagnóstico molecular têm se tornado uma ferramenta importante na detecção de agentes infecciosos intracelulares, como é o caso da bactéria *Chlamydophila psittaci*, importante agente causador da Clamidiofilose em psitacídeos e da Psitacose em humanos, e *Mycoplasma spp.*, agente da Micoplasmose Aviária, que vem a ser o foco principal desse trabalho.

As doenças respiratórias podem ser causadas por diversos agentes, sejam eles virais, parasitários, bacterianos, fúngicos, ou até mesmo deficiências nutricionais, toxinas, ou associações entre as mesmas. Os agentes virais mais conhecidos e estudados que podem causar doença respiratória são os da família Poxviridae, como é o caso do *Avipoxvirus*, *Paramyxovirus*, agente da doença de Newcastle, *Orthomyxoviridae*, causadores das influenzas, herpesvírus e adenovírus (Tully, 1995). Já os parasitas podem ser protozoários, como *Sarcocystis spp.*,

coccídeos, como *Cryptosporidia spp.*, ascarídeos e nematódeos (Godoy, 2006; Zucca e Delogu, 2008).

Animais de cativeiro estão comumente expostos às bactérias e fungos presentes no ambiente, seja através da comida, água, fômites ou até mesmo pelos outros animais companheiros. Tal fato é agravado quando em ambientes superpopulosos, em que há maior contanto físico entre os animais e competição intraespecífica, que frequentemente causa imunossupressão do indivíduo, seja por estresse ou até mesmo má-nutrição, favorecendo a infecção por agentes oportunistas. As bactérias mais comuns, presentes em isolados de trato respiratório de animais que apresentam sinais de doenças respiratórias, são: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Mycobacterium spp.* e *Nocardia asteroides* (Tully, 1995; Zwart, 2008).

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota normal em humanos e animais, podendo ser patogênica, em animais imunossuprimidos, principalmente quando associada a outros agentes oportunistas, como *Candida spp.* ou outras bactérias do grupo *Enterobacteriaceae* (Godoy, 2006; Zwart, 2008). Salmonelas são responsáveis por causar doença em mamíferos, aves, répteis e insetos, sendo altamente contagiosa, podendo causar inúmeros sinais clínicos inespecíficos (Godoy, 2006; Zwart, 2008). A *Klebsiella spp.* é pouco encontrada em animais saudáveis, estando as espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* mais envolvidas em processos mórbidos nas aves podendo causar sinais clínicos respiratórios, assim como já descrito em infecções causadas por *Bordetella avium* e *B. bronchiseptica*. Pneumonia, aerossaculite e broncopneumonia caseosa já foram descritas em infecções causadas por *Pseudomonas spp.* e também por *Mycobacterium spp.* (Godoy, 2006; Zwart, 2008). *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* podem ser isolados da microbiota das aves e são consideradas não patogênicas e não oportunistas, enquanto *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, e *Enterococcus spp.* também fazem parte da microbiota, mas podem se tornar patogênicos em circunstâncias como as descritas anteriormente (Godoy, 2006; Tully, 1995).

Em animais imunossuprimidos, agentes oportunistas ambientais, como o fungo *Aspergillus spp.*, podem ser isolados e normalmente estão associados a

rinites, sinusites, traqueítes e pneumonias granulomatosas difíceis de serem tratadas (Biasia e Giovanardi, 2001; Cray, 2011). Leveduras do gênero *Candida spp.*, que fazem parte da microbiota natural das aves, também podem ser secundárias a outras infecções e caracterizam-se por lesões esbranquiçadas principalmente na mucosa oral e faríngea (Biasia e Giovanardi, 2001; Silvanose, 2008). Menos comuns, mas que já foram isolados de aves com sinais clínicos respiratórios, são leveduras do gênero *Cryptococcus spp.* e *Malassezia spp.*, bactérias dos gêneros *Proteus spp.*, *Haemophilus spp.* e *Bordetella spp.*, e os fungos *Rhinosporidium spp.*, *Tricosporon spp.*, *Nocardia spp.*, *Curvularia spp.*, *Mucor spp.*, e *Abisidia spp.*, sendo que *Malassezia spp.* é suspeita de fazer parte da microbiota das aves (Biasia e Giovanardi, 2001; Tully, 1995). A espécie mais comum causadora das aspergiloses, e que é comumente isolada de psitacídeos, é o *Aspergillus fumigatus*, mas também ocorrem *A. flavus* e *A. niger*, que podem ser saprófitas ou determinar doença respiratória grave (Godoy, 2006; Redig, 2008).

### **3. MICOPLASMOSE AVIÁRIA**

#### **3.1. Classificação e Características Morfológicas**

A micoplasmose é causada pelos *Mycoplasma spp.*, que são procariotos de tamanho muito pequeno (200-300nm), pleomórficos, que não possuem parede celular em sua constituição, fazendo deles estruturas não bacterianas pertencentes à classe Mollicutes. Os micoplasmas se multiplicam por autorreplicação ou fissão binária, e possuem um curto genoma de DNA circular de fita dupla (0.58-2.2Mbp), além de possuírem uma pequena relação G+C (23-40mol%). Durante muito tempo foram considerados parasitos extracelulares exclusivos; atualmente admite-se a existência de espécies de vida intracelular e outras que o fazem opcionalmente (Cavalheiro, 2001; Gerlach, 1994; Johansson e Pettersson, 2002; Kleven, 2008; Nascimento, 2000; OIE, 2008). O grupo dos micoplasmas inclui tanto espécies patogênicas quanto outras normais à microbiota do hospedeiro, e são capazes de habitar mamíferos, aves, répteis, artrópodes, plantas e peixes. Existem mais de 120 espécies de micoplasmas descritas. Esta grande diversidade advém do fato de que os micoplasmas são, em sua grande maioria, espécie- específicos, sendo difícil a infecção de uma dada espécie de micoplasma em mais de um hospedeiro (Cavalheiro, 2001; Dybvig e Voelker, 1996; Gerlach, 1994; Kleven, 2008). Após

sequenciamentos genéticos com base no segmento 16S rRNA, a classe Mollicutes foi dividida e organizada em oito gêneros: *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasmas*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*, sendo que apenas três, *Acholeplasma*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, infectam animais (Dybvig e Voelker, 1996; Kleven, 2008; Quinn et al., 2005).

### 3.2. Histórico e Distribuição Geográfica

A primeira identificação de um microrganismo da classe Mollicutes foi em 1898, sendo ele o agente etiológico da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina ("*Bovine Contagious Pleuropneumonia*"-BCPP), gerando assim a primeira classificação dos organismos em "*Pleuropneumonia-like*" (PPLO-like; Johansson e Pettersson, 2002; Nascimento, 2000; Nascimento et al., 2005; Quinn et al., 2005). A primeira descrição da micoplasmose aviária acredita-se ser de 1905, onde Dodd, na Inglaterra, a observou em perus e a denominou por "Pneumoenterite Epizootica", que só se tornou conhecida por Dickinson e Hinshaw em 1938, com a denominação de Sinusite Infecciosa (SI) dos perus (Kleven, 2008; Nascimento, 2000; Nascimento et al., 2005). O primeiro diagnóstico publicado no Brasil de Doença Respiratória Crônica (DRC) em galinhas foi realizado em São Paulo na década de 1960 (Nascimento, 2000; Nascimento et al., 2005).

Vinte e três espécies de *Mycoplasma spp.* já foram descritas em hospedeiros aviários (Tabela 2), sendo que a maior parte delas foi encontrada em aves domésticas, como galinhas e perus. Dezesete, das vinte e três espécies de *Mycoplasma spp.* já foram isoladas também de espécies de aves selvagens, sendo que, até o momento, cinco delas foram vistas exclusivamente nas mesmas (*M. buteonis*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gypis* e *M. sturni*; Cavalheiro, 2001; Gerlach, 1994; Kleven, 2008; Luttrell e Fischer, 2007). Dentre todas, quatro são bastante conhecidas e estudadas em espécies domésticas em razão da alta perda econômica gerada à produção na avicultura moderna: *M. gallisepticum* (MG), agente da DRC em galinhas e da SI em perus, *M. synoviae* (MS), causador de sinusite em galinhas e perus e pode estar associado a doença subclínica de trato respiratório superior, *M. iowae* (MI), responsável pela alta mortalidade embrionária e baixa taxa de eclodibilidade em perus, e *M. meleagridis* (MM), associado a alterações do

esqueleto axial em perus (Gomes et al., 2010; Kleven, 2008; Ley, 2008; Nascimento, 2000; Nascimento et al., 2005; OIE, 2008; Wang et al., 1997).

**Tabela 2:** Espécies de *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, e *Ureaplasma* que já foram isoladas de hospedeiros aviários.

<b>Agente Isolado</b>	<b>Hospedeiro(s) Descrito(s)</b>
<i>A. axanthum</i>	Anseriformes
<i>A. equifetale</i>	Galliformes
<i>A. laidlawii</i>	Vários
<i>M. anatis</i>	Anseriformes, Falconiformes, Gruiformes
<i>M. anseris</i>	Anseriformes
<i>M. buteonis</i>	Falconiformes
<i>M. cloacale</i>	Anseriformes, Galliformes
<i>M. columbinasale</i>	Columbiformes
<i>M. columbinum</i>	Columbiformes
<i>M. columborale</i>	Columbiformes, Falconiformes
<i>M. corogypsi</i>	Falconiformes, Ciconiformes
<i>M. falconis</i>	Falconiformes
<i>M. gallinarum</i>	Falconiformes, Galliformes
<i>M. gallinaceum</i>	Columbiformes, Falconiformes, Galliformes
<i>M. gallisepticum</i>	Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes
<i>M. gallopavonis</i>	Galliformes
<i>M. glycyphilum</i>	Galliformes
<i>M. gypis</i>	Falconiformes
<i>M. imitans</i>	Anseriformes, Psittaciformes
<i>M. iners</i>	Columbiformes, Falconiformes, Galliformes
<i>M. iowae</i>	Galliformes
<i>M. lipofaciens</i>	Galliformes
<i>M. meleagridis</i>	Galliformes
<i>M. pullorum</i>	Columbiformes, Galliformes
<i>M. sturni</i>	Passeriformes
<i>M. synoviae</i>	Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Passeriformes
<i>U. gallorale</i>	Galliformes

Fonte: Cavalheiro, 2001; Gerlach, 1994; Luttrell e Fischer, 2007; Kleven, 2008 (modificados).

As micoplasmoses aviárias têm distribuição mundial, de acordo com relatos sobre MG, MS, MI, MM e outros micoplasmas (Gerlach, 1994; Nascimento, 2000; OIE, 2008). No Brasil, vários estudos já foram realizados, e foram isolados espécies de micoplasmas em hospedeiros aviários de espécies domésticas, como galinhas e perus (Cavalheiro, 2001; Nascimento, 2000). Há pouca informação sobre a prevalência de infecções por micoplasmas em aves silvestres de cativeiro ou de vida livre no Brasil e no mundo (Gerlach, 1994; Gomes et al., 2010).

No Brasil já foram realizados estudos em várias espécies de aves silvestres, constatando-se a presença de micoplasmas em diferentes regiões do país. Duarte et al. (2006) identificaram a presença de *Mycoplasma spp.* em passeriformes

assintomáticos de cativeiro na cidade de Itanhaém – São Paulo. Por meio de testes sorológicos, Souza (2007) e Ferreira (2012) obtiveram animais positivos para MG e MS também no estado de São Paulo, sendo as amostras obtidas de diversas espécies de aves silvestres de vida livre e columbiformes sinantrópicos, respectivamente. Andrade (2012) também obteve, por meio de testes sorológicos, psitacídeos de cativeiro positivos para MG e MS no estado de Goiás. Gomes et al. (2010, 2012) identificaram MG em psitacídeos de cativeiro e vida livre que morreram por diversos motivos, e posteriormente, o isolamento tanto de MG quanto de MS em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) de cativeiro que apresentava sinais clínicos de caráter respiratório, ambos no estado de Minas Gerais. Mais recentemente, Marques et al. (2012) identificaram a presença de MG em tinamídeos de cativeiro também por meio de testes sorológicos.

### **3.3. Patogenicidade e Patogenia**

Os micoplasmas mais estudados, MG, MS, MM e MI, podem causar infecções subclínicas ou aparentes em galinhas, perus e outras aves. Existem várias cepas de MG que já foram diferenciadas tanto fenotípica como genotipicamente. Quando nas aves, estas cepas podem apresentar graus diferenciados de patogenicidade, virulência, e imunogenicidade (Kleven, 2008; Nascimento, 2000). Sabe-se, que nas aves domésticas, o reservatório natural de MG e MS sejam as membranas mucosas do trato respiratório superior e urogenital, respectivamente, das galinhas e perus, enquanto o MM esteja presente naturalmente nas membranas mucosas do trato genital (cloaca e oviduto) e respiratório dos perus. Já o MI, por sua vez, é encontrado em mucosas do trato intestinal e urogenital dos perus, podendo ocorrer também nas galinhas (Nascimento, 2000), caracterizando os problemas, e conseqüentemente, os sinais clínicos respiratórios, articulares e urogenitais (Nascimento, 2000; Kleven, 2008; Quinn et al., 2005).

É na membrana plasmática, composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e fosfolipídeos, que os micoplasmas possuem os determinantes antigênicos mais importantes responsáveis pelos estímulos do sistema humoral e celular de defesa do hospedeiro (Dybvig e Voelker, 1996; Nascimento, 2000). Algumas destas proteínas são capazes de se ligar às membranas celulares do hospedeiro, podendo causar a lise celular. Sabe-se ainda que a morte celular

hospedeira pode ocorrer por meio de hemolisinas, fatores ciliostáticos, proteases e nucleases produzidas pelos micoplasmas. Os micoplasmas podem ficar em estado de latência, em que não é reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro, podendo ser pela permanência intracelular ou pela localização nas vilosidades das membranas celulares devido ao seu pequeno tamanho (Gerlach, 1994; Nascimento, 2000).

### **3.4. Transmissão**

Os micoplasmas possuem baixa infectividade sendo necessária grande proximidade física entre os indivíduos para que haja a sua transmissão (Tully, 1995). Dessa forma, observa-se maior susceptibilidade daqueles animais mantidos em ambientes com grande densidade populacional (Luttrell e Fischer, 2007). As principais portas de entrada do agente são as vias respiratórias e genitais, sendo as secreções respiratórias, orais e gonadais responsáveis pela transmissão. Sacos aéreos infectados também podem infectar gônadas por contato direto (Abdul-Rahman e Bradbury, 1996; Gerlach, 1994; Luttrell e Fischer, 2007). Estudos mostram que a transmissão de micoplasmas em galinhas podem ocorrer tanto de forma horizontal, de um animal para outro, como de forma vertical, quando a mãe infecta o ovo, sendo este último o caso especificamente do MM (Cavalheiro, 2001; Chin et al., 2008). A transmissão entre aves de vida livre e de produção ainda não está totalmente esclarecida, porém Fiorentin e Jaenisch (1994) consideraram as Pombas-rolas (*Columbina picui*) como uma possível fonte de transmissão para galinhas de produção.

### **3.5. Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos das micoplasmoses variam de acordo com a espécie animal afetada, densidade populacional, condições de confinamento e outras situações que permitam o aumento da exposição individual da ave aos microrganismos. Geralmente a morbidade é alta mas a mortalidade não, sendo que a última pode depender de fatores secundários (Cavalheiro, 2001; Murakami et al., 2002). Quando causadas por MG, os sinais clínicos observados podem ser estridores respiratórios, dispneia, descarga nasal, e conjuntivite (Cookson e Shivaprasad, 1994; Ganapathy e Bradbury, 1998; Gomes et al., 2012; Hartup et al., 2001; Murakami et al., 2002). Em perus e em algumas espécies de aves silvestres, é comum também o

desenvolvimento de uma sinusite infraorbital (Gomes et al., 2010; Kleven, 2008; Luttrell e Fischer, 2007). As manifestações clínicas normalmente são de desenvolvimento lento e a doença tende a ser de curso demorado. Aerossaculites severas podem ser observadas, em geral quando associadas a infecções concomitantes, como já descrito em casos de Bronquite Infecciosa, Doença de Newcastle e infecções por *Escherichia coli* (Gomes et al., 2010; Kleven, 2008).

Apesar da alta ocorrência de aerossaculites causadas pelo MM em aves de produção, outros sinais clínicos de caráter respiratório são raramente observados. Animais afetados podem apresentar queda na produtividade, seja de carne ou ovos, condenação da carcaça, muitas vezes associada às lesões de sacos aéreos, e alterações no esqueleto (Chin et al., 2008). Animais infectados por MS frequentemente apresentam sinovite e, conseqüentemente, claudicação, edema articular e até retardo no crescimento (Kleven e Ferguson-Noel, 2008). MI está relacionada à baixa eclodibilidade dos ovos, morte embrionária, ainda nos primeiros dias de incubação, aerossaculite, nanismo e desordens do aparelho locomotor (Abdul-Rahman e Bradbury, 1996; Bradbury e Kleven, 2008).

Em infecções causadas pelo agente *M. imitans*, em aves silvestres, foram observados sinais clínicos similares aos da infecção por MG. *Mycoplasma gallinaceum* e *M. gallinarum* que são agentes conhecidos por causarem aerossaculite em seus hospedeiros, enquanto o *M. pullorum*, que já foi isolado tanto de espécies domésticas quanto de vida livre, causou baixa eclodibilidade dos ovos de perus (Kleven e Ferguson-Noel, 2008). Das espécies de micoplasmas isoladas de gansos, *M. anseris* foi associada a sinais clínicos como aerossaculite, peritonite e morte embrionária, enquanto *M. cloacale* apresentou infertilidade, inflamação de cloaca e falo, baixa taxa de crescimento e também morte embrionária. Em patos, *M. anatis* associado a outros agentes infecciosos, foram relatados sinais clínicos como claudicação, dispnéia, diarreia e perda de equilíbrio, caracterizando uma doença de caráter neurológico (Stipkovits e Szathmary, 2012). *Mycoplasma columbinum*, *M. columbinasale* e *M. columborale* também foram descritos relacionados a sinais clínicos respiratórios em columbiformes (Kleven e Ferguson-Noel, 2008).

### 3.6. Alterações Anatomopatológicas

Na necropsia, as lesões causadas por micoplasmas em seus hospedeiros podem ter diferentes graus mas não diferentes formas de apresentação (Gerlach, 1994). Já foram descritas alterações como: conjuntivite serosa à serofibrinosa, rinite, sinusite, traqueite, broncopneumonia focal e aerossaculite. A cavidade nasal e do seio infraorbital frequentemente exibem secreção seromucóide à fibrinosa unilateral, que também podem ser observadas na coana. Em patos, perus, e outras aves silvestres, o exsudato pode ser semigelatinoso, fibrinoso ou caseoso, e leva à distensão do seio infraorbital. As mucosas da cavidade nasal ficam edemaciadas e podem apresentar petéquias (Gerlach, 1994; Luttrell e Fischer, 2007). As alterações histopatológicas podem variar dependendo das infecções secundárias, sejam bacterianas, virais, ou fúngicas (Gerlach, 1994; Schmidt et. al., 2003).

A pneumonia é uma complicação rara observada nas micoplasmoses aviárias, e na maioria dos casos, é causada por infecções secundárias como *Escherichia coli*. Quando em infecções com colonização da mucosa do trato urogenital, pode-se observar lesões teciduais, embora a colonização do falo seja imperceptível. Histologicamente as lesões são principalmente vistas na parte da mucosa, onde a maioria das glândulas estão situadas. Proliferação submucosa de folículos linfáticos e infiltração disseminada de linfócitos para o tecido são as principais anormalidades histológicas. Em gansos, o falo pode estar edemaciado e coberto com exsudato fibrinoso, e pode, tornar-se necrótico, quando na presença de infecções secundárias (Gerlach, 1994; Schmidt et al., 2003).

### 3.7. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por *Mycoplasma spp.* pode ser feito através da observação dos sinais clínicos e observação das lesões macro e microscópicas no exame post-mortem/necroscópico. Para o diagnóstico definitivo o ideal é o isolamento do *Mycoplasma spp.* O diagnóstico epidemiológico pode ser feito com base na análise dos dados coletados durante a investigação de um surto ou por ocasião de um monitoramento, sendo eles: período de incubação, morbidade, mortalidade, parâmetros de produção, entre outros. A identificação do agente etiológico pode dar-se de duas formas: sorologia e/ou isolamento e identificação do micoplasma. Os métodos sorológicos de triagem mais empregados são a Soro

Aglutinação Rápida (SAR) e o *Enzime-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Para confirmação do resultado do diagnóstico sorológico a Inibição da Hemaglutinação (HI) é recomendada (Luttrell e Fischer, 2007; Nascimento, 2000; OIE, 2008). Os diagnósticos diferenciais para as micoplasmoses aviárias incluem uma série de doenças bacterianas, fúngicas e virais. A clamidífilose é a principal delas quando suspeita da micoplasmosose em psitacídeos, pombos, patos e gansos, e o linfoma, em galinhas, quando em casos mais avançados da doença, devido às alterações histopatológicas observadas (Gerlach, 1994).

Os diferentes métodos diagnósticos podem ser feitos a partir de amostras biológicas de animais vivos, carcaças frescas, ou carcaças que foram congeladas ainda frescas (Gerlach, 1994; OIE, 2008). Dos animais vivos podemos coletar sangue, *swabs* de coana, orofaringe, esôfago, traqueia, olhos, cloaca e falo, enquanto de animais mortos podemos coletar amostras de cavidade nasal, seio infraorbital, traqueia e sacos aéreos (Gerlach, 1994; Nascimento, 2000; OIE, 2008). Pode-se ainda fazer o cultivo a partir de exsudatos aspirados da cavidade celomática e/ou do seio infraorbital, e de embriões mortos de ovos que ainda não foram chocados (OIE, 2008).

### 3.7.1. Soro Aglutinação Rápida - SAR

O teste SAR consiste na detecção de anticorpos do hospedeiro anti-micoplasma. É considerado um teste rápido, disponível comercialmente, relativamente barato e sensível, amplamente utilizado como um monitoramento inicial na detecção da infecção em grupos aviários comerciais. Porém, reações cruzadas inespecíficas podem ser observadas em grupos infectados por MS ou que foram vacinados recentemente, sendo necessária diluição prévia do soro para que tal efeito seja amenizado. É altamente sensível na detecção de imunoglobulinas do tipo IgM, que é a primeira a ser produzida em casos de infecção (Ley, 2008).

Para a realização da SAR, é necessário o volume de aproximadamente 0,02mL de soro do animal a ser analisado. Caso a amostra precise ser armazenada ela deve ser resfriada a 4°C, e não congelada, durante não mais de 72 horas. Os antígenos de MG e MS utilizados na reação em questão são disponíveis comercialmente. Após a cuidadosa homogeneização do soro da ave com o antígeno, a mistura deve ser aquecida a 56°C durante 30 minutos para depois ser

realizada a leitura, das amostras e dos controles positivo e negativo. Na SAR uma amostra é considerada positiva quando é notada uma nítida reação de caráter flocular entre o soro contendo anticorpos contra MG ou MS e o antígeno na proporção de diluição de 1/4 ou mais (OIE, 2008).

#### *3.7.2. Inibição da Hemaglutinação - HI*

O teste de HI é comumente utilizado para confirmação de reações positivas detectadas na SAR ou, mais recentemente, após testes de ELISA. É considerado um teste demorado e de pequena sensibilidade, além dos reagentes não serem comercialmente disponíveis (Ley, 2008). A HI é válida apenas para as espécies de micoplasmas hemaglutinantes, ou seja, capazes de causar hemaglutinação das células vermelhas do hospedeiro, sabe-se que o MG e o MS são hemaglutinantes (Gerlach, 1994).

Para a realização do teste é necessário uma amostra de suspensão de hemácias obtidas do soro do animal amostrado, além dos antígenos das cepas dos agentes a serem testados. A leitura da reação é feita após lenta homogeneização das amostras, aguardados 50 minutos à temperatura ambiente. Na HI uma amostra é considerada positiva quando há nítida aglutinação das hemácias da amostra sanguínea do animal amostrado (OIE, 2008).

#### *3.7.3. Enzime-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*

O teste de ELISA, que consiste em um ensaio imunoenzimático na detecção de anticorpos anti-micoplasma da amostra sanguínea do hospedeiro, foi desenvolvido primariamente para aumentar a eficiência, sensibilidade e especificidade dos ensaios de SAR e HI. Os *kits* comerciais são disponíveis e utilizados com frequência no monitoramento de infecções em aviários comerciais. Em geral, o teste de ELISA é considerado pouco menos sensível, porém com maior especificidade quando comparado ao HI, sendo utilizado com mais frequência na atualidade (Ley, 2008; OIE, 2008).

#### *3.7.4. Cultura Microbiológica*

O teste ouro para infecção por micoplasmas, na avicultura moderna, é a confirmação da presença do agente, o que pode ser feito tanto pelo cultivo quanto pela PCR. A cultura microbiológica normalmente é demorada, cara e só é realizada

por laboratórios especializados (Kempf, 1998; Ley, 2008). As espécies de micoplasmas de aves geralmente requerem meios enriquecidos em proteína (10-15% de soro animal), temperatura entre 37-38°C. Eles são resistentes ao acetato de tálio e à penicilina, que são usados para inibição do crescimento de bactérias e fungos em cultivos de micoplasma (Gerlach, 1994; Kleven, 2008). Normalmente entre 3-10 dias formam-se microcolônias de forma circular e convexa. Quando iluminadas de forma oblíqua suas colônias apresentam um formato de "ovo frito" ou "mamilar" que variam de 0,01-0,50mm de diâmetro (zona central densa que cresce para o interior do ágar). A maioria dos micoplasmas é anaeróbia facultativa, sendo que alguns crescem otimamente em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> e necessitam de lipídios, principalmente colesterol, para o crescimento. A diferenciação entre os micoplasmas pode ser feita com base na especificação quanto ao hospedeiro, características das colônias, requerimento para colesterol e reações bioquímicas (Kleven, 2008; Nascimento, 2000; OIE, 2008; Quinn et al., 2005).

#### *3.7.5. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR*

A PCR baseia-se na amplificação enzimática do fragmento de DNA do agente, em escala exponencial, que depois pode ser detectado a partir de eletroforese em gel de agarose. As sequências de oligonucleotídeos do agente infeccioso em questão são derivados do espaço 16S-23S RNA ribossomal (Kempf, 1998; Kuppeveld et al., 1992). É considerada uma técnica menos complexa, rápida, e de alta sensibilidade e especificidade (Kempf, 1998; Ley, 2008). Protocolos de PCR Multiplex já foram estabelecidos, onde pode ser feita a identificação de várias espécies de micoplasmas em uma única reação, porém ainda não foi validado para amostras clínicas (Khan, 2002; OIE, 2008; Wang et al., 1997). Segundo a OIE (2008), vários são os métodos citados por Kempf (1998) e um manual publicado por Lauerman (1998) que são válidos na identificação de MG, MS e outro micoplasmas aviários com base na sequência contida no rRNA 16S.

### **3.8. Tratamento e Controle**

A ausência da parede celular dos micoplasmas faz com que sejam sensíveis à maioria dos desinfetantes (amônia quartenária, compostos iodados, fenólicos e álcool), e à inativação fora do hospedeiro (sobrevivem apenas algumas horas em superfícies secas, e 2-4 dias em água). Esta ausência de parede celular também os

tornam naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana, a exemplo das penicilinas, cefalosporinas, bacitracina e as sulfonamidas (Gerlach, 1994; Luttrell e Fischer, 2007; Nascimento, 2000). Os antimicrobianos mais indicados são aqueles que se acumulam em altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório, como é o caso da tilosina, espiramicina, eritromicina, tiamulina e enrofloxacin. Pode-se ainda fazer a associação entre espectinomicina e clindamicina ou pleuromutilina (Gerlach, 1994; Nascimento, 2000).

Para um maior controle da infecção por micoplasmas deve-se aliar a quarentena de animais novos no plantel às técnicas de limpeza e desinfecção dos ambientes em que as aves estão alojadas, seguido de controle da densidade populacional, uma vez que quando muito alta propicia a transmissão do microrganismo (Allgayer e Cziulik, 2007; Gerlach, 1994; Salle e Silva, 2000). A erradicação dos agentes MG, MS e MM é legalmente mandatária no Brasil, e é uma meta adotada pela indústria avícola para se adequar aos padrões, de sanidade avícola, exigidos mundialmente (Gomes et al., 2010). Na avicultura moderna, faz-se o uso da imunoprofilaxia para cepas de MG e MS naquelas criações que a exposição aos agentes infecciosos seja inevitável (OIE, 2008), sendo estas vacinas inativadas ou vivas atenuadas (Nascimento et al., 2005).

## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GERAL**

Verificação da ocorrência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de cativeiro de criadouros do Distrito Federal-DF, Brasil.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Comparação dos achados clínicos entre os animais positivos ou negativos no teste diagnóstico de PCR para micoplasma;
- b. Comparação das condições ambientais em que os animais positivos ou negativos são criados;
- c. Comparação da microbiota isolada do trato respiratório inferior dos animais estudados, entre sexos e local de criação;

- d. Comparação da microbiota isolada entre os animais positivos ou negativos no teste para micoplasma;
- e. Avaliação do efeito da diversidade da microbiota respiratória isolada nos parâmetros de saúde.

## REFERÊNCIAS

ABDUL-RAHMAN, S.A., BRADBURY, J.M. *Mycoplasma iowae*: a review. **Avian Pathology**, v. 25, p. 205-229, 1996.

ALLGAYER, M.C., CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 344-350, 2007.

ANDRADE, M.A. Chlamydophila spp., Mycoplasma gallisepticum e Mycoplasma synoviae em psitacídeos (filo: Chordata, ordem: Psittaciformes) de diferentes cativeiros do estado de Goiás. UFG: Goiânia, Dissertação (Mestrado), 2012. p.

ANDRIOLO, A. Desafios para a Conservação da Fauna. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 1ª Edição, 2006. 951p.

BIASIA, I., GIOVANARDI, A.A. Fungal Infections - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Critically Endangered Birds: A Global Audit**. Cambridge: BirdLife International, 2008.

BRADBURY, J.M., KLEVEN, S.H. *Mycoplasma iowae* infection. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12ª Edição, 2008. 1260p.

CARCIOFI, A.C. Nutrition - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

CASTRO, A.G.M. Enfermidades do Sistema Respiratório. In: BERCHIERI JUNIOR, .A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

CAVALHEIRO, M.L. Miscellaneous diseases - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

CBRO, COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Listas das Aves do Brasil**. CBRO, 9ª Edição, 2010.

CHIN, R.P., GHAZIKHANIAN, Y.G., KEMPF, I. *Mycoplasma meleagridis* infection. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12ª Edição, 2008. 1260p.

COOKSON, K.C., SHIVAPRASAD, H.L. *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chukar Partridges, Pheasants, and Peafowl. **Avian Diseases**, v. 38, p. 914-921, 1994.

CRAY, C. Infectious and Zoonotic Disease Testing in Pet Birds. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, p. 71-85, 2011.

DUARTE, V.V., SINHORINI, J.A., ALLEGRETTI, L., FERREIRA, V.C.A., IKUNO, A.A., GUIMARÃES, M.B. Identificação de *Mycoplasma spp.* em passeriformes mantidos em cativeiro na cidade de Itanhaém - SP. In: IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. **Relatório de Atividades das ASM - Áreas de Soltura e Monitoramento de Animais Silvestres**. 2006. 58p.

DYBVIG, K., VOELKER, L.L. Molecular biology of Mycoplasmas. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 25-57, 1996.

FERREIRA, V.L. Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo. USP: São Paulo, Dissertação (Mestrado), 2012. 78p.

FIORENTIN, L., JAENISCH, F.R. Tentativa de infecção experimental da pomba-rola (*Columbina picui*) com *Mycoplasma synoviae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 573-575, 1994.

FORSYTH, J.M. **Parrots of the World**. Princeton: Princeton University Press, 2010. 328p.

GANAPATHY, K., BRADBURY, J.M. Pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* in red-legged partridges. **Avian Pathology**, v. 27, p. 455-463, 1998.

GERLACH, H. Mycoplasma and Rickettsia. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth: Wingers Publishing Inc., 1994. 1384p.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 1ª Edição, 2006. 951p.

GOMES, A.M., COSTA, L.L., VILELA, D.A.R., MARQUES, M.V.R., CARVALHAES, A.G., MARIN, S.Y., COSTA, M.P., HORTA, R.S., RESENDE, J.S., MARTINS, N.R.S. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 75-78, 2010.

GOMES, A.M., ORTIZ, M.C., CARVALHAES, A.G., MARTINS, N.R.S. *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) com doença respiratória - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, n. 98, 2012.

GUEDES, N.M.R., SCHERER, P.N. Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

HARRISON, G.J., TULLY, T.N.Jr. Pneumology. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth: Wingers Publishing, Inc., 1994. 1384p.

HARTUP, B.K., BICKAL, J.M., DHONDT, A.A., LEY, D.H., KOLLIAS, G.V. Dynamics of conjunctivitis and *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches. **The Auk**, v. 118, n. 2, p. 327-333, 2001.

IUCN, THE WORLD CONSERVATION UNION. **A Global Species Assessment**. Cambridge: IUCN, 2004.

JOHANSSON, K.E., PETTERSSON, B. Taxonomy of Mollicutes. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 572p.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 27, p. 07-14, 1998.

KHAN, M.I. Multiplex PCR of Avian Pathogenic Mycoplasmas. **Methods in Molecular Biology**, v. 216, p. 223-229, 2002.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12<sup>a</sup> Edição, 2008. 1260p.

KLEVEN, S.H., FERGUSON-NOEL, N. *Mycoplasma synoviae* infection. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12<sup>a</sup> Edição, 2008. 1260p.

KLEVEN, S.H., FERGUSON-NOEL, N. Other mycoplasmal infections. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12<sup>a</sup> Edição, 2008. 1260p.

KUPPEVELD, F.J.M., LOGT, J.T.M., ANGULO, A.F., ZOEST, M.J., QUINT, W.G.V., NIESTERS, H.G.M., GALAMA, J.M.D., MELCHERS, W.J.G. Genus- and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 08, p. 2606-2615, 1992.

LAUERMAN, L.H. Mycoplasma PCR Assays. In: LAUERMAN, L.H. **Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases**. Auburn: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 1998. 152p.

LEY, D.H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12<sup>a</sup> Edição, 2008. 1260p.

LUTTRELL, P., FISCHER, J.R. Mycoplasmosis. In: THOMAS, N.J., HUNTER, D.B., ATKINSON, C.T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Ames: Blackwell Publishing, 1<sup>a</sup> Edição, 2007. 484p.

MARQUES, M.V., FERREIRA JUNIOR, F.C., ANDERY, D.A., FERNANDES, A.A., ARAÚJO, A.V., RESENDE, J.S., DONATTI, R.V., MARTINS, N.R. Health assessment of captive tinamids (Aves, Tinamiformes) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 03, p. 539-348. 2012.

MMA, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. MMA, 2003.

MURAKAMI, S., MIYAMA, M., OGAWA, A., SHIMADA, J., NAKANE, T. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. **Avian Pathology**, v. 31, p. 363-370, 2002.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, .A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

NASCIMENTO, E.R., PEREIRA, V.L.A., NASCIMENTO, M.G.F., BARRETO, M.L. Avian mycoplasmosis update. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 1, p. 01-09, 2005.

OIE, WORLD ORGANISATION OF ANIMAL HEALTH. Chapter 2.3.5. - Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In: OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)**. Paris: OIE, 2008.

QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J.C., LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 1<sup>a</sup> Edição, 2005. 512p.

RAPPOLE, J.H., HUBÁLEK, Z. Migratory Birds and West Nile virus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 47S-58S, 2003.

REDIG, P. Fungal diseases - Aspergilosis - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

RENTAS, REDE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES. **1º Relatório Nacional Sobre o Tráfico de Fauna Silvestre**. Brasília: RENTAS, 2001.

SALLE, C.T.P., SILVA, A.B. Prevenção de Doenças/Manejo Profilático/Monitoração. In: BERCHIERI JUNIOR, .A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

SAMOUR, J. Clinical Examination. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

SEHGAL, R.N.M. Deforestation and avian infectious diseases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 955-960, 2010.

SCHMIDT, R.E., REAVILL, D.R., PHALEN, D.N. Respiratory System. In: SCHMIDT, R.E., REAVILL, D.R., PHALEN, D.N. **Pathology of Pet and Aviary Birds**. Ames: Blackwell Publishing, 1ª Edição, 2003. 234p.

SICK, H. Ordem Psittaciformes. In: SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912p.

SILVANOSE, C. Fungal diseases - Candidiasis - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

SOUZA, E. Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas as instalações agrícolas. Jaboticabal: UNESP, Dissertação (Mestrado), 2007. 72p.

STIPKOVITS, L., SZATHMARY, S. Mycoplasma infection of ducks and geese - Review. **Poultry Science**, v. 91, p. 2812-2819, 2012.

TULLY, T.N.Jr. Avian Respiratory Diseases: Clinical Overview. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 9, n. 3, p. 162-174, 1995.

UNEP-WCMC, UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE. **Species Database: CITES - Listed Species**. UNEP-WCM, 2013.

WANG, H., FADL, A.A., KHAN, M.I. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, p. 211-216, 1997.

WERNERY, U. Viral diseases - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

WERTHER, K. Viral Diseases - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1<sup>a</sup> Edição, 2001. 536p.

ZUCCA, P., DELOGU, M. Arthropods - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

ZUCCA, P., DELOGU, M. Helminthes - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

ZUCCA, P., DELOGU, M. Protozoa - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

ZWART, P. Bacterial diseases - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

## CAPÍTULO II

### ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE *MYCOPLASMA SPP.* EM PSITACÍDEOS DE DOIS CRIADOUROS DO DISTRITO FEDERAL

#### INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias nas aves podem ser causadas por diversos agentes, sejam eles virais, parasitários, bacterianos, fúngicos, ou podem até mesmo ser causadas por deficiências nutricionais, toxinas, ou associações entre as mesmas (Tully, 1995). Animais de cativeiro estão comumente expostos às bactérias e fungos presentes no ambiente, seja através da comida, água, fômites ou até mesmo pelos outros animais companheiros (Zwart, 2008). Dentre estas, os micoplasmas são agentes comuns causadores de doenças em aves domésticas sendo o *M. gallisepticum* e *M. synoviae* os agentes mais envolvidos em perdas econômicas na avicultura moderna de galinhas e perus (Kleven, 2008). Existem inúmeras espécies descritas que já foram isoladas de hospedeiros aviários, inclusive silvestres, sendo que algumas delas exclusivamente neles (Luttrell e Fischer, 2007). Relatos e estudos investigativos com relação à prevalência e infecção de micoplasmas em psitacídeos ainda é muito escasso (Lierz e Hafez, 2009). No Brasil já foram realizados estudos em psitacídeos constatando-se a presença de MG e MS no estado de Minas Gerais (Gomes et al., 2010; 2012).

Os micoplasmas possuem baixa infectividade sendo necessária grande proximidade física entre os indivíduos para que haja a sua transmissão, e são caracterizados em sua maioria, por manifestação subclínica. Geralmente a morbidade é alta mas a mortalidade não, sendo que a última pode depender de fatores secundários, como por exemplo co-infecções (Cavalheiro, 2001; Murakami et al., 2002; Tully, 1995). Dessa forma, observa-se maior susceptibilidade daqueles animais mantidos em ambientes com grande densidade populacional.

Os sinais clínicos das micoplasmoses variam muito de acordo com aspectos relacionados ao hospedeiro e a fatores ambientais (Cavalheiro, 2001; Luttrell e Fischer, 2007). Para um maior controle da infecção por micoplasmas deve-se aliar a quarentena de animais novos no plantel às técnicas de limpeza e desinfecção dos ambientes em que as aves estão alojadas (Allgayer e Cziulik, 2007; Gerlach, 1994; Salle e Silva, 2000). Para o correto diagnóstico de infecções causadas por micoplasmas, deve-se tentar aliar o histórico do animal aos sinais clínicos, além de testes sorológicos, que são utilizados com frequência na rotina de manejo de aviários comerciais de aves domésticas. A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) tem se tornado uma grande aliada atualmente. É considerada uma técnica menos complexa, rápida, e de alta sensibilidade e especificidade, e sendo que já existem protocolos estabelecidos e reconhecidos pela OIE (Kempf, 1998; Ley, 2008).

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *Mycoplasma spp.*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em psitacídeos de cativeiro de criadouros do DF, avaliar as condições sanitárias ambientais em que os animais estudados são criados, avaliar a microbiota isolada de trato respiratório inferior, e compará-los aos achados clínicos de animais positivos e negativos no teste de PCR.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. ANIMAIS E ÁREAS DE COLETAS**

Mediante aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (processo número 31901/2011), foram amostrados 135 psitacídeos adultos de cativeiro, das mais

variadas espécies oriundos de 02 localidades no Distrito Federal-DF, Brasil, no período que compreendeu os meses de maio a setembro de 2012.

### **1.2. Fundação Jardim Zoológico de Brasília**

A instituição possui em seu plantel inúmeras espécies de animais, sendo eles aves, répteis e mamíferos. Os animais são de várias origens, podendo ser de criadouros comerciais, conservacionistas, permuta com outros zoológicos ou do Centro de Triagem de Animais Silvestres - DF (CETAS). Foram amostrados 90 animais, sendo 01 *Ara glaucogularis*, 03 *Anodorhynchus hyacinthinus*, 04 *A. macao*, 06 *Amazona amazonica*, 02 *Ara severus*, 03 *Diopsittaca nobilis*, 03 *A. xanthops*, 13 *A. aestiva*, 20 *A. ararauna*, 04 *Primolius maracana*, 01 *Aratinga acuticaudata*, 01 *Orthopsittaca manilata*, 01 *Primolius auricolis*, 02 *Deroptryus accipitrinus*, 02 *Amazona kawalli*, 01 *Amazona farinosa*, 04 *Amazona festiva*, 04 *Amazona ochrocephala*, 01 *Pionus maximiliani*, 03 *Amazona autumnalis*, 01 *Amazona brasiliensis*, 02 *Amazona rhodocorytha*, e 08 *A. chloropterus*. Os animais amostrados são mantidos em recintos separados, de acordo com as diferentes espécies, dentro de uma área em comum da instituição. Fica localizada em Brasília-DF, Brasil (15°50'40.77"S e 47°56'35.98"O).

### **1.2. Criadouro Conservacionista Spa Zen**

No criadouro são alojadas inúmeras espécies de aves silvestres, sendo elas passeriformes, psitacídeos e ranfastídeos oriundos do CETAS-DF. As aves chegam ao criadouro onde permanecem por tempo indeterminado e sem que se tenha qualquer informação sobre seu histórico. Foram amostrados o total de 45 animais, sendo 40 *A. aestiva*, e 05 *A. ararauna*. Os animais amostrados são mantidos em recintos separados, de acordo com as diferentes espécies, dentro de uma área em comum da instituição. Fica localizado em Brasília-DF, Brasil (15°54'21.33"S e 47°54'52.33"O).

Nenhuma colheita era realizada sem o respectivo endosso dos responsáveis legais dos animais ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido . A colheita de informações relativas aos criadouros era feita *in loco*. As colheitas de material biológico foram realizadas nos criadouros. As análises do material coletado foram

realizadas nas dependências dos laboratórios de apoio diagnóstico do Hospital Veterinário de Pequenos Animais - HVET da Universidade de Brasília - UnB.

## **2. CONTENÇÃO FÍSICA E QUÍMICA**

As aves foram submetidas ao jejum alimentar de pelo menos 06 horas anteriores ao procedimento. A contenção física inicial foi feita por meio das mãos, panos e puçás, e foi realizada pelos próprios funcionários responsáveis pelo manejo diário dos animais de cada criador, para minimizar o estresse gerado. As aves eram então rapidamente encaminhadas para a mesa de procedimentos da equipe de pesquisa para que fossem submetidas à contenção química. O protocolo de contenção química empregou o fármaco isoflurano<sup>1</sup> administrado por via inalatória através de vaporizador universal<sup>2</sup>, por meio de máscara plástica em circuito aberto. Esta técnica é segura e permite um rápido retorno anestésico. Durante todo o período transanestésico, eram feitos o monitoramento da temperatura corporal pela cloaca (através de um termômetro digital<sup>3</sup>), da frequência respiratória (visualização e contagem dos movimentos de inspiração) e da frequência cardíaca (número de batimentos por minuto aferido com o detector vascular<sup>4</sup>; Figura 1). Após a colheita do material, o retorno anestésico era acompanhado e era feito com o animal dentro de uma caixa plástica tampada e ventilada. Este cuidado evitou possíveis ferimentos traumáticos no animal e das pessoas que o manuseavam. Assim que o animal retornasse ao seu estado de propriocepção, era então encaminhado de volta ao seu recinto de origem (Bailey, 2008; Godoy, 2006; Lawton, 2008; Rossi Jr., 2006).

---

<sup>1</sup> Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira-SP, Brasil.

<sup>2</sup> Modelo Takaoka KT-15, KTK® Ind. Exp. Imp. e Com. Equip. Hosp. Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

<sup>3</sup> Termômetro Digital Geratherm Baby Flex, Geratherm® Medical AG, Germany.

<sup>4</sup> Detector Vascular Veterinário Portátil, Microem® Produtos Médicos Ltda., Ribeirão Preto-SP, Brasil.



**Figura 1:** Monitoramento da frequência cardíaca com o auxílio do detector vascular veterinário portátil (Arquivo pessoal).

### **3. AVALIAÇÃO CLÍNICA INDIVIDUAL**

A avaliação clínica individual abrangia os seguintes aspectos: dados gerais, protocolo anestésico, características do recinto, exame físico e outras informações abaixo discriminadas (anexo Ilustração II.1). Eram coletados ainda, dados referentes às espécies criadas no mesmo local, o número total de indivíduos da instituição, e a frequência e o tipo de materiais utilizados na higienização dos recintos e utensílios usados na rotina (Clubb e Flammer, 1994; Godoy, 2006; Samour, 2008).

#### **3.1. Dados Gerais**

Identificação individual na pesquisa, faixa etária (jovem ou adulto), data da coleta, peso (medido durante o período transanestésico, dentro de sacos de panos acoplados à balança portátil do tipo dinamômetro<sup>5</sup>, precisão de 1g), espécie, identificação do animal (p. ex. anilha, microchip, tatuagem), origem, tempo no criadouro, e número do recinto.

#### **3.2. Protocolo Anestésico**

Fármaco utilizado, dose, via de administração, transcurso anestésico (bom, razoável ou ruim), e recuperação anestésica (boa, razoável ou ruim).

---

<sup>5</sup> LightLine, Pesola AG®, Baar, Switzerland.

### 3.3. Características do Recinto

Número total de animais, condição sanitária geral (ruim, regular ou boa), tipo de recinto (gaiola pequena, gaiola grande, gaiola de reprodução ou incubadora), cobertura (descoberto, coberto ou parcialmente coberto), piso (natural ou artificial, tipo), poleiro (ausente ou presente, tipo), comedouro (ausente ou presente, tipo), e bebedouro (ausente ou presente, tipo). Os aspectos levados em consideração para a avaliação sanitária foram: condição geral dos recintos, dos comedouros, bebedouros, poleiros, grades, chão e teto, perímetro físico, e quando presentes, utensílios utilizados na higienização dos mesmos.

### 3.4. Exame Físico

Aparência geral (doente ou saudável), atitude (ativo ou apático), comportamento (dócil ou indócil), condição de carnes (caquético, magro, normal ou obeso), estado de hidratação (desidratado ou normohidratado), palpação hepática (normal, pouco aumentado ou muito aumentado), ectoparasitas (nenhum, poucos ou muitos, local e tipo), empenamento (cobertura - boa, regular ou ruim, aparência - boa, regular ou ruim, e cor - boa, regular ou ruim; Figura 2), e descrição de alterações observadas (sistema tegumentar, região buco facial, olhos, sistemas locomotor, respiratório, digestório e neurológico).



**Figura 2:** Inspeção de rêmiges e retrizes, como parte da avaliação clínica individual (Arquivo pessoal).

### **3.5. Outras Informações**

Tipo, frequência e quantidade de alimento, suplementações alimentares, e tipo e frequência de vermifugação e imunoprofilaxia.

## **4. COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Durante o período transanestésico eram feitas a colheita de sangue, ectoparasitas, além de *swabs* estéreis de cloaca, orofaringe e traqueia. O sangue era utilizado para a realização de hemograma e dosagens bioquímicas séricas. Os ectoparasitas eram identificados e quantificados. O *swab* cloacal e de orofaringe eram utilizados para identificação do agente *Mycoplasma spp.* através da PCR. O *swab* de traqueia era utilizado para o cultivo microbiológico de bactérias e fungos. Todo o material coletado era armazenado e transportado no interior de caixas de isopor preenchidas com gelo biológico, afim de que as amostras permanecessem conservadas e protegidas durante todo o trajeto do local das coletas às dependências dos laboratórios de destino.

### **4.1. Sangue**

A colheita era feita através da venopunção da veia radial-ulnar (Figura 3) ou jugular dos animais, sendo o volume total coletado inferior ou igual ao equivalente a 1% do peso vivo do indivíduo. Foram utilizadas seringas (1mL e 3mL) e agulhas (0,55x20mm e 0,7x25mm) estéreis para a colheita, e o sangue obtido era então colocado em microtubos do tipo *ependorf*, sendo um com anticoagulante (ácido etileno diamino tetracético - EDTA potássico) e outro sem anticoagulante (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006).



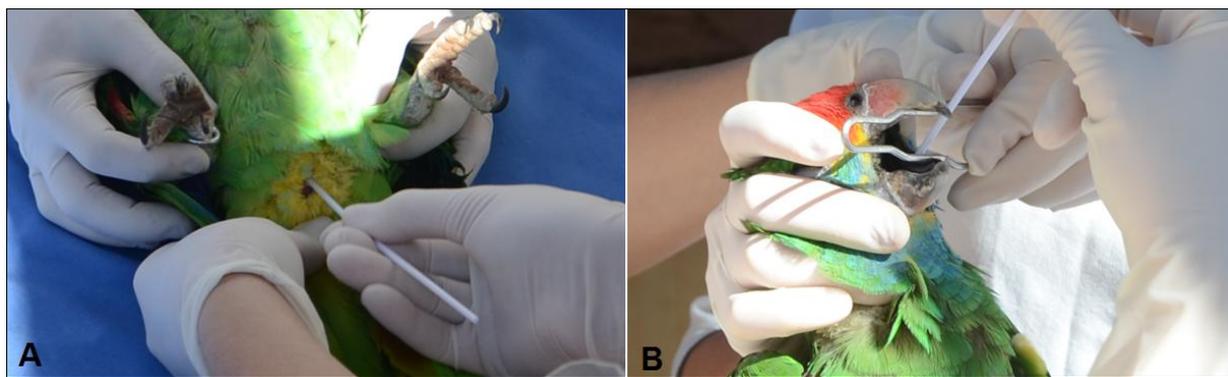
**Figura 3:** Colheita de sangue da veia radial-ulnar de *Amazona aestiva* (Arquivo pessoal).

#### **4.2. Ectoparasitas**

Os ectoparasitas eram coletados, com o auxílio de uma pinça anatômica, e fixados em etanol 70% em microtubos identificados (Howlett, 2008).

#### **4.3. Swab Cloacal e Orofaríngeo**

Para a colheita de material biológico da cloaca e da orofaringe dos animais (Figura 4) foram utilizados swabs estéreis, que eram acondicionados em microtubos contendo 1mL de meio PBS ("*Phosphate Buffered Saline*" - Solução Salina Tamponada com Fosfato; anexo Tabela III.1) e eram então identificados, acondicionados para o transporte, e posteriormente congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até que fosse feito o processamento prévio para a PCR (Gomes et al., 2010).

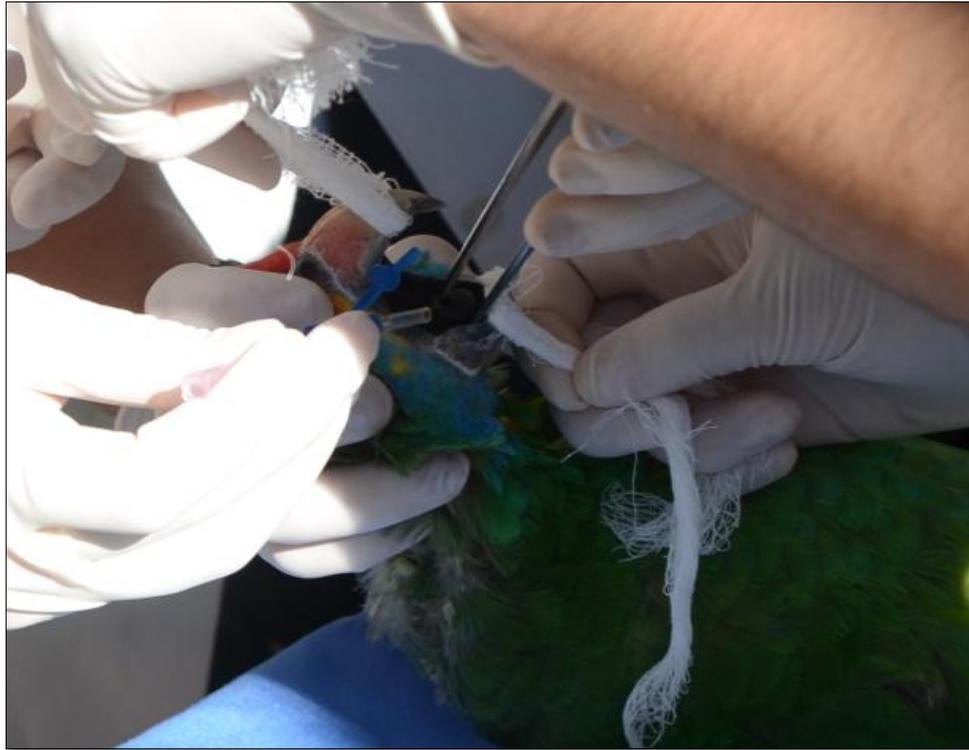


**Figura 4:** A - Swab cloacal de *Amazona rhodocorytha*; B - Swab orofaríngeo de *Amazona rhodocorytha* (Arquivo pessoal).

#### 4.4. Swab Traqueal

A técnica de colheita de material biológico traqueal, que era posteriormente utilizado para cultura microbiológica, era feita por meio da introdução de um protetor externo e posteriormente do swab estéril em seu interior. Todo o material utilizado era previamente autoclavado, o grupo de pesquisa fazia uso de gorros, luvas e máscaras de procedimento, e ainda, o pesquisador responsável pela manipulação do material de colheita o fazia com o auxílio de luvas estéreis e próximo a uma fonte de calor<sup>6</sup>, cuidados estes tomados para evitar possíveis contaminações ambientais do material obtido. Foram utilizadas duas técnicas diferentes, de acordo com o peso vivo do animal. Para o grupo dos que pesavam mais de 1000g, foram utilizadas como protetores externos (para proteger o swab estéril de contaminações quando da introdução no interior da traqueia), sondas esofágicas de número 20, cortadas em fragmentos de comprimento total igual a 08cm. Para as aves que pesavam menos do que 1000g eram utilizados swabs desenvolvidos e fabricados pelos próprios pesquisadores (anexo Ilustração II.2, II.3 e II.4), que eram introduzidos no interior da traqueia protegidos externamente por um fragmento de 07cm de comprimento, de uma sonda uretral de número 10 (Figura 5). Os swabs traqueais eram acondicionados no interior de microtubos contendo 1mL de meio de transporte microbiológico chamado BHI ("*Brain Heart Infusion*" - Infuso de Cérebro e Coração; anexo Tabela III.2), até as dependências do laboratório, para sua posterior inoculação nos meios de cultura (Redig, 2008).

<sup>6</sup> Mini Fogareiro Júpiter, Nautika Comercial de Artigos para Lazer Ltda., Guarulhos-SP, Brasil.



**Figura 5:** Colheita de material traqueal de *Amazona rhodocorytha* por meio de swab desenvolvido pelo grupo de pesquisa (Arquivo pessoal).

## 5. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

### 5.1. Hemograma

As amostras de sangue com anticoagulante eram encaminhadas e processadas, na mesma data das coletas, no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária - LPCV do HVET, UnB. O tempo entre a colheita do sangue e a realização do hemograma não ultrapassava 06 horas. Para a realização da contagem de hemácias, leucócitos totais e trombócitos, as amostras de sangue foram diluídas, na proporção de 1:200, em solução Natt & Herrick, e as células foram contadas em câmara de contagem espelhada de Neubauer<sup>Improved</sup>. O volume globular (VG) foi determinado usando-se a técnica do microhematócrito, as proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro manual, e a concentração de hemoglobina foi mensurada pelo método cianometahemoglobina<sup>7</sup> em aparelho analisador de bioquímicos semiautomático<sup>8</sup>. Dado estas etapas, seguia-se para a contagem diferencial leucocitária (total de 100 células), feita por microscopia óptica a partir do esfregaço sanguíneo da amostra de

<sup>7</sup> Kit Comercial, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG, Brasil.

<sup>8</sup> Bio-2000®, Bioplus - Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

sangue com anticoagulante corada por *May-Grunwald-Giemsa* - MGG (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006).

## 5.2. Bioquímica Sérica

As amostras de sangue sem anticoagulante também eram encaminhadas e processadas no LPCV, UnB. Os microtubos, sem anticoagulante, eram centrifugados a 3.000 rpm durante 5 minutos para a separação do soro (Campbell, 1995; Almosny e Monteiro, 2006). A realização dos ensaios bioquímicos (proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina - FA, ácido úrico, creatinina e creatina cinase - CK) eram feitos em aparelho analisador de bioquímicos semiautomático<sup>9</sup> utilizando kits comerciais<sup>10</sup>, seguindo as recomendações do fabricante (anexo Tabela III.4).

## 5.3. Cultura Microbiológica

Os microtubos contendo os *swabs* traqueais eram encaminhados, na mesma data da colheita, ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária - MMB do HVET, UnB. Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, o *swab* era removido do interior do microtubo e então, através da técnica de esgotamento por estrias, inoculado em 03 placas de *Petri* diferentes: uma contendo Ágar Sangue e duas contendo Ágar Dextrose Sabouraud (anexo Tabela III.3). Após inoculação do material coletado, a placa com o meio sólido Ágar Sangue era levada à estufa (37°C) durante 48 horas, e quando notado crescimento de colônias bacterianas, a mesma era levada à geladeira (4°C) para permanência necessária até a identificação do microrganismo. A placa de *Petri* plástica descartável com o meio sólido de Ágar Dextrose Sabouraud também era levada à estufa (37°C), durante 05 dias, seguida de geladeira (4°C) para identificação da presença de leveduras. Já a segunda placa de *Petri* de vidro com o meio sólido Ágar Dextrose Sabouraud, permanecia durante no máximo 21 dias em temperatura ambiente (30°C), sendo realizadas 02 leituras semanais, para posterior identificação de possíveis crescimentos fúngicos (Levy et al., 1992; Quinn et al., 1994; Xavier et al., 2009).

---

<sup>9</sup> Bio-2000®, Bioplus - Produtos para Laboratório Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

<sup>10</sup> Kit Comercial, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG, Brasil.

### 5.3.1. Identificação Bacteriana

Para que fosse feita a identificação das bactérias, era feita uma série de testes e etapas. Primeiro era feita a descrição macroscópica da colônia em meio Ágar Sangue: presença/ausência de hemólise, tamanho, cor, cheiro, e brilho; classificação em morfologia e Gram-positivo ou negativo através de visualização em microscopia óptica da lâmina corada pelo método de Gram, e reação no teste de oxidação/fermentação, catalase e oxidase. Para o grupo das classificadas como Gram-negativas, era feito ainda o teste de habilidade para crescer em Ágar MacConkey. Quando não identificado o gênero bacteriano, apenas com as etapas citadas anteriormente, outros testes específicos para cada grupo eram realizados (anexo Tabela III.5 à Tabela III.23; Quinn et al., 1994; Quinn et al., 2005).

### 5.3.2. Identificação Fúngica

Para a identificação de leveduras, isoladas em Ágar Dextrose Sabouraud depois de 5 dias na estufa, era feita a observação macroscópica da colônia e a visualização em microscopia óptica da lâmina corada pelo método de Gram. Quando identificado o crescimento fúngico nas placas de Ágar Dextrose Sabouraud mantidas à temperatura ambiente, era feita a observação macroscópica da colônia (tamanho, cor, espessura e aparência) e a observação direta das estruturas fúngicas por microscopia óptica coradas por azul de lactofenol, classificando-as em gênero (Quinn et al., 1994; Quinn et al., 2005).

## 5.4. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR

Os microtubos devidamente identificados contendo o meio PBS e os *swabs* cloacais e orofaríngeos eram encaminhados, na mesma data das colheitas, para o Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do HVET, UnB, onde eram armazenados e mantidos a -20°C para posterior extração de DNA e realização da reação de polimerização em cadeia (PCR). Para a realização da extração e purificação de DNA as amostras eram descongeladas à temperatura ambiente, por aproximadamente 40 minutos, e em seguida eram agitadas e homogeneizadas, em agitador tipo vórtex, para então serem submetidas às etapas de extração realizadas por meio do kit comercial<sup>11</sup>, seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos

---

<sup>11</sup> Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit®, GE Healthcare do Brasil Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

das extrações, retornavam a -20°C até que fossem utilizados nas PCRs subsequentes.

Foram realizados 2 tipos de exames moleculares para cada amostra extraída: determinação de sexo (1) e detecção do gênero *Mycoplasma spp.* (2). Para aquelas amostras, positivas na PCR para gênero *Mycoplasma spp.*, eram realizados ainda outros 2 tipos de exames moleculares: detecção das espécies *M. gallisepticum* (3) e *M. synoviae* (4). Os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados para cada exame molecular estão descritos na Tabela 3. Em todas as reações foi utilizado o mesmo aparelho termociclador<sup>12</sup> e os produtos obtidos nas PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e observado sob transiluminador de fluorescência ultravioleta. Para melhor visualização dos produtos era usado um marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen®) em cada eletroforese. O surgimento de produtos na altura coincidente aos pares de bases dos controles positivos, e do marcador molecular, eram considerados positivos para a reação em questão. Como controle negativo, em todas as reações, foi usada água miliQ (estéril e desprovida de DNA), e para controle positivo, foram usados produtos da extração de vacinas comerciais para *M. gallisepticum*<sup>13</sup> e *M. synoviae*<sup>14</sup>.

**Tabela 3:** Segundo as reações de PCR realizadas na pesquisa: sequência de oligonucleotídeos, fonte consultada, gene amplificado e tamanho dos produtos da amplificação.

Reação	Oligonucleotídeos	Nome / Autores	Gene / Tamanho do Produto
Sexagem	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	2550F (Fridolfsson e Ellegren, 1999)	<i>CHD1-W</i> / 450bp
	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	2718R (Fridolfsson e Ellegren, 1999)	<i>CHD1-Z</i> / 650bp
<i>Mycoplasma spp.</i>	ACACCATGGGAG(C/T)TGTAAT	JUMY1 (Harasawa et al., 1993)	16S-23S <i>rRNA</i> /
	CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT	JUMY2 (Nakagawa et al., 1992)	370bp-500bp
<i>M. gallisepticum</i>	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	JUG1 (OIE, 2008)	16s <i>rRNA</i> /
	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC	JUG2 (OIE, 2008)	185bp
<i>M. synoviae</i>	GAGAAGCAAATAGTGATATCA	JUS1 (OIE, 2008)	16s <i>rRNA</i> /
	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA	JUS2 (OIE, 2008)	200bp

<sup>12</sup> MyCycler, Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc., Califórnia, E.U.A.

<sup>13</sup> Mycovax® TS-11, Merial Saúde Animal, Campinas-SP, Brasil.

<sup>14</sup> Mycovax® MS-H, Merial Saúde Animal, Campinas-SP, Brasil.

#### 5.4.1. Sexagem

A PCR de sexagem foi realizada para determinar o sexo dos indivíduos amostrados, levando em consideração que todas as espécies eram monomórficas, e ainda, para confirmação de que o DNA das amostras foi devidamente extraído e que não ocorreram possíveis inibidores da reação durante o processo de extração. Nesta PCR foram utilizados os oligonucleotídeos 2550F e 2718R (Tabela 3) para detecção dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z*, respectivamente. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes na mistura foram: 2,0µL de DNA, 2,5µL de tampão de PCR (10X), 1,0µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM/1mL), 2,0µL de cada oligonucleotídeo, 0,25µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados, 0,25µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/ µL) e água miliQ para um volume final de 25,0µL. Na amplificação da reação foram utilizadas as condições do protocolo seguido por Quintana e colaboradores (2008) com adaptações, sendo: fase de desnaturação, 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C a 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 54°C por 45 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, e 72°C por 30 segundos para a extensão das fitas, e por fim, extensão final a 72°C a 5 minutos seguido de resfriamento a 4°C. Estes oligonucleotídeos geram dois produtos finais com diferença de aproximadamente 200 pares de bases de diferença entre eles. Quando observado a presença dos dois pares de bases (ZW) a amostra é de uma fêmea, enquanto quando observado apenas um produto (ZZ), a ave é considerada macho (Quintana et al., 2008).

#### 5.4.2. Gênero *Mycoplasma* spp.

Para a realização da PCR de gênero *Mycoplasma* spp. foram utilizados os oligonucleotídeos JUMY1 e JUMY2 (Tabela 3) para detecção dos genes *16S-23S rRNA*. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes na mistura foram: 1,0µL de DNA, 2,5µL de tampão de PCR (10X), 1,0µL MgCl<sub>2</sub> (50mM/1mL), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo, 0,2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados, 0,25 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/ µL) e água miliQ para um volume final de 25,0 µL. Na amplificação da reação foram utilizadas as condições do protocolo seguido por Sung e colaboradores (2006) com adaptações, sendo: fase de desnaturação, 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 64°C por 30 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, e

72°C por 60 segundos para a extensão das fitas, e por fim, extensão final a 72°C a 5 minutos seguido de resfriamento a 4°C. Estes oligonucleotídeos geram um produto final de peso molecular de 370bp a 500bp (Sung et al., 2006).

#### 5.4.3. Espécie *Mycoplasma gallisepticum*

Para a realização da PCR de gênero *Mycoplasma spp.* foram utilizados os oligonucleotídeos JUG1 e JUG2 (Tabela 3) para detecção do gene *16S rRNA*. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes na mistura foram: 1,0µL de DNA, 2,5µL de tampão de PCR (10X), 1,0µL MgCl<sub>2</sub> (50mM/1mL), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo, 0,2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados, 0,25 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/ µL) e água miliQ para um volume final de 25,0 µL. Na amplificação da reação foram utilizadas as condições do protocolo seguido por OIE (2008) com adaptações, sendo: fase de desnaturação, 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 55°C por 30 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, e 72°C por 60 segundos para a extensão das fitas, e por fim, extensão final a 72°C a 5 minutos seguido de resfriamento a 4°C. Estes oligonucleotídeos geram um produto final com peso molecular aproximado de 185bp (Garcia et al., 2005).

#### 5.4.4. Espécie *Mycoplasma synoviae*

Para a realização da PCR de gênero *Mycoplasma spp.* foram utilizados os oligonucleotídeos JUS1 e JUS2 (Tabela 3) para detecção do gene *16S rRNA*. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes na mistura foram: 1,0µL de DNA, 2,5µL de tampão de PCR (10X), 1,0µL MgCl<sub>2</sub> (50mM/1mL), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo, 0,2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados, 0,25 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/ µL) e água miliQ para um volume final de 25,0 µL. Na amplificação da reação foram utilizadas as condições do protocolo seguido por OIE (2008) com adaptações, sendo: fase de desnaturação, 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 55°C por 30 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, e 72°C por 60 segundos para a extensão das fitas, e por fim, extensão final a 72°C a 5 minutos seguido de resfriamento a 4°C. Estes oligonucleotídeos geram um produto final com peso molecular aproximado de 200bp (Lauerma et al., 1993).

## **6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As variáveis dependentes (parâmetros de saúde) foram testadas pelo teste de normalidade de Cramer-von Mises (alfa=0,05). A maior parte das variáveis foi considerada não normal, e foram retestadas com os valores logaritimizados. Nesta segunda abordagem transformada, a maioria das variáveis seguiu um padrão de distribuição normal. Apesar disto procedeu-se a análise dos dados via ANOVA, visto que o número de amostras ultrapassa 100 indivíduos e a ANOVA é robusta o suficiente para aceitar estes desvios de normalidade (Zar, 2010). Cada variável dependente foi testada para a existência de correlação com o peso corporal dos animais. Quando houve probabilidade abaixo de 0,1, foi testado o modelo de ANOVA com o peso como um co-variado; caso este não fosse significativo no modelo, era retirado o fator peso do modelo. Foram testados vários modelos mistos lineares. Os fatores testados foram sexo, criadouro, infecção por *Mycoplasma spp.* e microbiota respiratória. Como dito, o peso foi utilizado como co-variado e a espécie dos indivíduos como um fator aleatório. Para cada combinação destes fatores foi verificado, através de uma análise de LogLikelihood, qual modelo representava melhor o conjunto de dados. O limite alfa para um fator ser considerado significativo foi 0,05. Foi testada a similaridade da distribuição do IICR entre criadouros e sexo através do teste de Chi-quadrado, novamente com um alfa de 0,05. Finalmente, foi testada a existência de correlação entre os valores de PPT (refratômetro) e PT (bioquímica convencional), com um método não-paramétrico de Spearman.

## **RESULTADOS**

### **1. ANIMAIS E ÁREAS DE COLHEITAS**

Para o maior entendimento, os animais foram divididos em 02 grupos de acordo com a sua origem, sendo: G1 - Fundação Jardim Zoológico de Brasília, e G2 - Criadouro Conservacionista Spa Zen. Todos os animais eram pertencentes à Ordem Psittaciformes, adultos e das mais variadas espécies. Eram eles pertencentes a 10 gêneros e 23 espécies distintas conforme listadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Relação de todas as espécies, e respectivas quantidades de indivíduos amostradas no presente estudo de acordo com o criadouro de origem.

<b>Espécie</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>Total</b>
<i>Alipiopsitta xanthops</i>	03	00	03
<i>Amazona aestiva</i>	13	40	53
<i>Amazona amazonica</i>	06	00	06
<i>Amazona autumnalis</i>	03	00	03
<i>Amazona brasiliensis</i>	01	00	01
<i>Amazona farinosa</i>	01	00	01
<i>Amazona festiva</i>	04	00	04
<i>Amazona kawalli</i>	02	00	02
<i>Amazona ochrocephala</i>	04	00	04
<i>Amazona rhodocorytha</i>	02	00	02
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	03	00	03
<i>Ara ararauna</i>	20	05	25
<i>Ara chloropterus</i>	08	00	08
<i>Ara glaucogularis</i>	01	00	01
<i>Ara macao</i>	04	00	04
<i>Ara severus</i>	02	00	02
<i>Aratinga acuticaudata</i>	01	00	01
<i>Deropterus accipitrinus</i>	02	00	02
<i>Diopsittaca nobilis</i>	03	00	03
<i>Orthopsittaca manilata</i>	01	00	01
<i>Pionus maximiliani</i>	01	00	01
<i>Primolius auricolis</i>	01	00	01
<i>Primolius maracana</i>	04	00	04
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>45</b>	<b>135</b>

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2).

Os dois criadouros amostrados passaram por uma avaliação qualitativa sanitária, realizada pela equipe. As atribuições foram dadas em boa, regular ou ruim, sendo estas independentes entre si. As duas instituições forneciam dieta adequada para o grupo em questão e utilizavam de água e sabão para higienização dos recintos, fômites e dos outros materiais utilizados. Outros fatores avaliados, referentes aos tipos dos recintos, também foram observados e estão listados a seguir (Tabela 5).

**Tabela 5:** Descrição de aspectos referentes aos recintos e avaliação qualitativa sanitária dada aos locais amostrados.

<b>Grupo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Recintos</b>			<b>Avaliação Sanitária</b>
		<b>Densidade</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Piso</b>	
<b>G1</b>	Alambrado	Baixa	Parcial	Natural	Boa
<b>G2</b>	Alambrado	Alta	Parcial	Natural	Regular

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2).

## 2. CONTENÇÃO FÍSICA E QUÍMICA E AVALIAÇÃO CLÍNICA INDIVIDUAL

Todos os animais responderam bem à indução, manutenção e recuperação anestésicas, e não apresentaram qualquer tipo de alteração digna de nota

relacionada à técnica realizada. Em nenhum animal foi observada a presença de ectoparasitas. Com relação ao exame físico individual, realizado em todos os animais, nenhum indivíduo apresentou sinal clínico de doença respiratória.

### 3. HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Não se obteve diferenças estatísticas dos parâmetros hematológicos quando analisado o fator "sexo", porém quando analisado o fator "criador", o mesmo teve influência nos valores de contagem do número total de hemácias, e concentrações de hemoglobina, AST e ácido úrico (Tabela 6). Não houve nenhum parâmetro hematológico, através das análises estatísticas, que tenha sido alterado naqueles animais em que foi diagnosticada a presença do agente *Mycoplasma spp.*

**Tabela 6:** Análise estatística dos hemogramas e dos bioquímicos séricos dos animais amostrados de acordo com o criadouro de origem.

Parâmetro	G1 (n=90)	G2 (n=45)
	Valores Paramétricos X ± DP (min. - máx.)	
VG (%)	45,50 ± 4,18 (34 - 56)	44,90 ± 4,18 (36 - 55)
Hemácias (x10 <sup>6</sup> x µL <sup>-1</sup> )***	2,60 ± 0,70 (1,00 - 5,50)	2,30 ± 0,70 (1,00 - 4,40)
Hemoglobina (g/dL)***	10,20 ± 2,10 (4,60 - 17,80)	8,90 ± 2,10 (4,60 - 11,10)
<b>Hemograma</b>		
Trombócitos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	21,70 ± 14,30 (3,30 - 142,60)	21,40 ± 14,30 (5,40 - 46,50)
PPT (g/dL)	4,10 ± 0,60 (2,80 - 6,40)	4,00 ± 0,60 (3,00 - 5,60)
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	12,22 ± 12,58 (0,69 - 135,90)	11,29 ± 12,58 (2,41 - 33,02)
Heterófilos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	7,10 ± 7,60 (0,00 - 77,40)	6,70 ± 7,60 (1,20 - 24,10)
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	2,50 ± 2,60 (0,10 - 21,70)	2,10 ± 2,60 (0,10 - 7,60)
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	0,10 ± 0,10 (0,00 - 0,50)	0,20 ± 0,10 (0,00 - 0,50)
Monócitos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	2,30 ± 3,40 (0,10 - 36,70)	2,20 ± 3,40 (0,30 - 11,60)
Basófilos (x10 <sup>3</sup> X µL <sup>-1</sup> )	0,30 ± 0,20 (0,00 - 0,90)	0,30 ± 0,20 (0,00 - 0,80)
<b>Bioquímicos</b>		
PT (g/dL)	3,17 ± 0,74 (1,50 - 6,70)	3,12 ± 0,74 (1,50 - 6,70)
Albumina (g/dL)	1,10 ± 0,32 (0,50 - 2,30)	1,00 ± 0,32 (0,50 - 2,00)
AST (UI/L)**	171 ± 90 (41 - 749)	139 ± 90 (41 - 314)
FA (UI/L)	48,40 ± 35,10 (6 - 208)	50,70 ± 35,10 (6 - 152)
Ácido Úrico (mg/dL)*	5,35 ± 3,29 (0,60 - 22,50)	4,96 ± 3,29 (0,60 - 12)
Creatinina (mg/dL)	0,23 ± 0,10 (0,10 - 0,60)	0,22 ± 0,09 (0,10 - 0,50)
CK (UI/L)	149 ± 177 (24 - 1020)	144 ± 177 (24 - 995)

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2); Volume globular (VG); Proteínas plasmáticas totais (PPT); Proteínas totais séricas (PT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatina cinase (CK); Média (X); Desvio padrão (DP); Mínimo (mín.); Máximo (máx.); p < 0,05\*; p < 0,005\*\*; p < 0,001\*\*\*.

### 4. CULTURA MICROBIOLÓGICA

Foram obtidos 120 *swabs* traqueais. Dos cultivos microbiológicos realizados a partir da inoculação dos mesmos, foram identificados colônias de bactérias, leveduras e fungos. As leveduras foram classificadas apenas em presente ou ausente, e as colônias bacterianas e fúngicas foram classificadas em sua maioria

em gênero e algumas em espécie. Foi feita ainda, a análise da prevalência de cada um dos microrganismos dentro do grupo amostrado, como listado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Relação das leveduras, gêneros e espécies das colônias bacterianas e fúngicas isoladas das amostras de *swab* traqueais, e suas respectivas prevalências dentro da população amostrada.

<b>Grupo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Prevalência</b>
<b>Bactérias</b>	<i>Actinomyces spp.</i>	2,50% (03/120)
	<i>Bacillus spp.</i>	30,00% (36/120)
	<i>Corynebacterium spp.</i>	26,67% (32/120)
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	5,00% (06/120)
	<i>Escherichia coli</i>	2,50% (03/120)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,83% (01/120)
	<i>Micrococcus spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Pasteurella spp.</i>	11,67% (14/120)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	1,67% (02/120)
	<i>Rhodococcus equi</i>	3,33% (04/120)
	<i>Staphylococcus spp.</i>	58,33% (70/120)
	<i>Streptococcus spp.</i>	10,00% (12/120)
<b>Leveduras</b>		52,50% (63/120)
	<i>Acremonium spp.</i>	7,50% (09/120)
	<i>Aspergillus spp.</i>	5,00% (06/120)
	<i>Chaetomium spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Curvularia spp.</i>	2,50% (03/120)
<b>Fungos</b>	<i>Epicoccum spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Fusarium spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Mucor spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Nigrospora spp.</i>	0,83% (01/120)
	<i>Penicillium spp.</i>	32,50% (39/120)
	<i>Rhizopus spp.</i>	3,33% (04/120)
	<i>Trichoderma spp.</i>	3,33% (04/120)

Apenas 05 animais, 4,17% (05/120), não tiveram crescimento de bactérias, leveduras ou fungos em suas amostras de *swab* traqueal, do restante, todos tiveram pelo menos um microrganismo isolado, seja ele bacteriano, fúngico ou levedura. Para melhor análise dos dados obtidos das culturas microbiológicas, os animais foram classificados quantitativamente em 03 grupos distintos de acordo com o somatório das diferentes colônias isoladas e identificadas dos microrganismos, sejam eles bacterianos, leveduras ou fúngicos, e foi denominada de Índice de Intensidade de Colonização Respiratória (IICR). Para aquele animal que teve entre 00 ou 01 colônia, deu-se o IICR 1, para aqueles que tiveram entre 02 e 05 colônias diferentes, IICR 2, e para os que tiveram 06 ou 07 tipos diferentes de colônias de microrganismos, IICR 3. Os IICRs são independentes entre si e 00 é igual à ausência de microrganismos e 07 o número máximo de diferentes colônias apresentadas pela população amostrada. A prevalência dos IICRs dentro de cada

criador e de acordo com o sexo estão representados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. As análises estatísticas realizadas mostraram que não há diferença estatística entre o número de agentes isolados do trato respiratório inferior quando empregados os fatores "sexo" ou "criador", porém apresentou diferença estatística ( $p=0,03$ ) na concentração de albumina sérica quando usado o "IICR" como fator (Figura 6).

**Tabela 8:** Prevalência dos IICRs dos indivíduos de acordo com o criadouro.

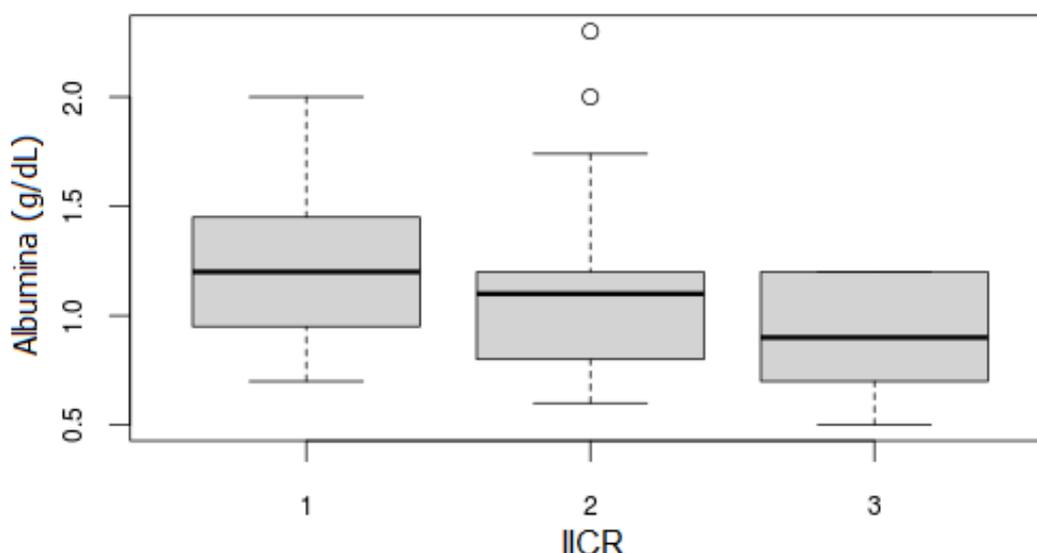
Grupo	IICR 1	IICR 2	IICR 3
<b>G1</b>	19,74% (15/76)	76,32% (58/76)	3,94% (03/76)
<b>G2</b>	13,64% (06/44)	81,81% (36/44)	4,55% (02/44)
<b>Total</b>	17,50% (21/120)	78,33% (94/120)	4,17% (05/120)

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2); Índice de Intensidade de Colonização Respiratória (IICR); Onde: IICR 1: 00 ou 01 tipo de microrganismo; IICR 2: 02 - 05 tipos diferentes de microrganismos; IICR 3: 06 ou 07 tipos diferentes de organismos; Sendo 00 igual à ausência completa de crescimento.

**Tabela 9:** Prevalência dos IICRs dos indivíduos de acordo com o sexo.

Sexo	IICR 1	IICR 2	IICR 3
<b>Fêmea</b>	42,86% (09/21)	45,74% (43/94)	20,00% (01/05)
<b>Macho</b>	57,14% (12/21)	54,26% (51/94)	80,00% (04/05)
<b>Total</b>	17,5% (21/120)	78,33% (94/120)	4,17% (05/120)

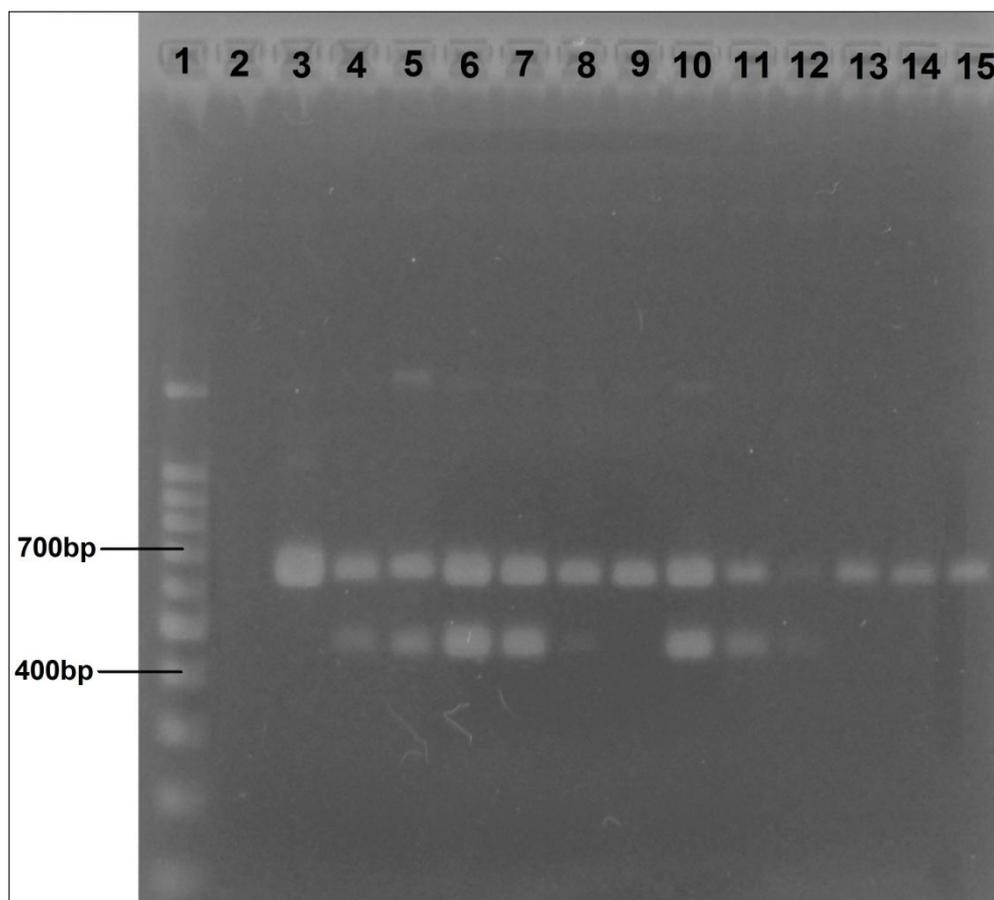
Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2); Índice de Intensidade de Colonização Respiratória (IICR); Onde: IICR 1: 00 ou 01 tipo de microrganismo; IICR 2: 02 - 05 tipos diferentes de microrganismos; IICR 3: 06 ou 07 tipos diferentes de organismos; Sendo 00 igual à ausência completa de crescimento.



**Figura 6:** Boxplot da variável concentração de albumina sérica quando analisado o IICR como fator.

## 5. PCR SEXAGEM

Foram obtidos *swabs* de orofaringe e cloaca de todos os animais amostrados. Durante a realização da PCR para sexagem das amostras de *swabs* de orofaringe e cloaca das aves, obteve-se a amplificação dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* a partir dos oligonucleotídeos 2550F e 2718R, que resultaram em produtos de aproximadamente 450bp e 650bp, respectivamente, com diferença de peso molecular entre eles de 200bp. As aves fêmeas apresentaram dois produtos de ambos os tamanhos citados (ZW), e os machos apenas um (ZZ; Figura 7). Dos 135 indivíduos, foram identificadas 43,70% fêmeas (59/135) e 56,30% machos (76/135), sendo a distribuição dos animais por sexo em cada grupo demonstrada na Tabela 10.



**Figura 7:** Resultado de PCR para sexagem das aves. 1 - Marcador de peso molecular (100bp<sup>15</sup>); 2 - Controle negativo (água miliQ); 3, 9, 13, 14, e 15 - Aves machos (ZZ); 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, e 12 - Aves fêmeas (ZW). Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

<sup>15</sup> 100bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>, E.U.A

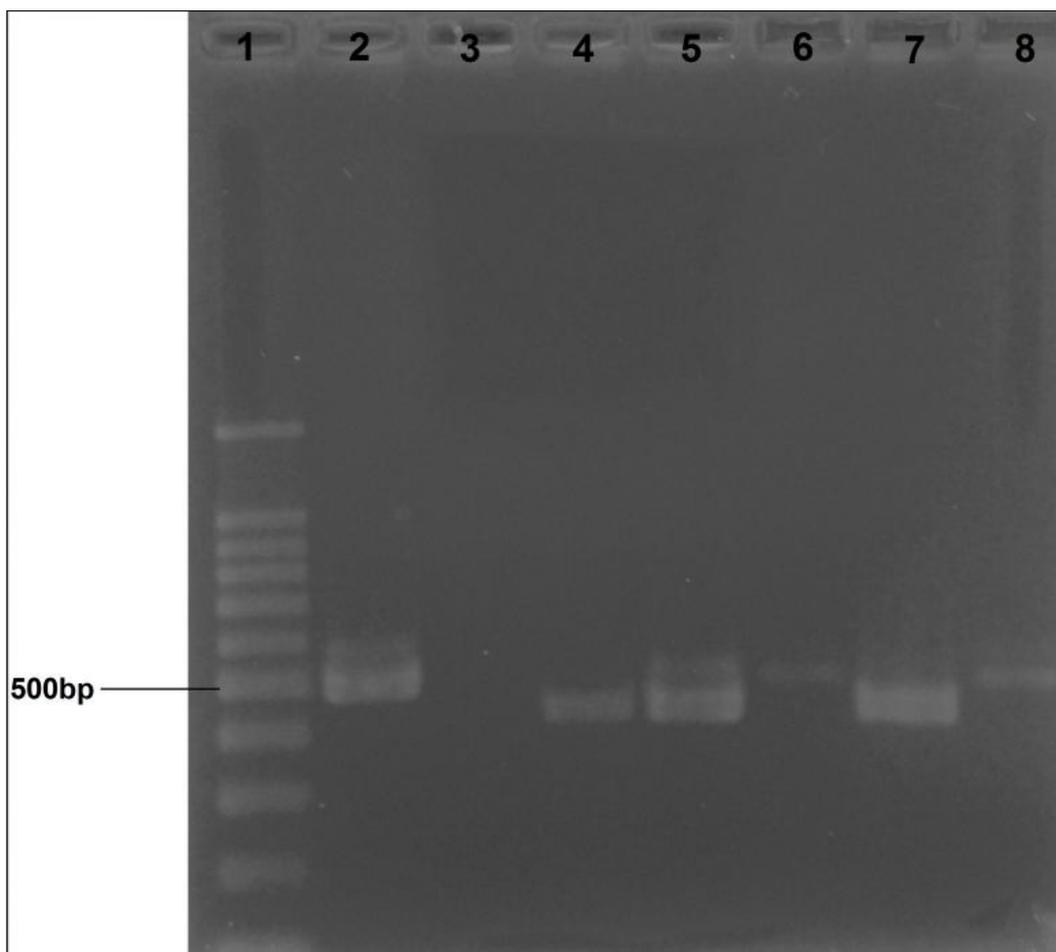
**Tabela 10:** Distribuição dos animais amostrados conforme o sexo dentro dos grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>
<b>G1</b> (90/135)	41	49
<b>G2</b> (45/135)	18	27
<b>Total</b>	59	76

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2).

## **6. PCR GÊNERO *MYCOPLASMA SPP.***

Na PCR para detecção do gênero *Mycoplasma spp.* das amostras de *swab* de orofaringe e cloaca das aves, obteve-se a amplificação dos genes *16S-23S rRNA* a partir dos oligonucleotídeos JUMY1 e JUMY2, gerando os produtos variando de 370bp a 500bp (Figura 8). Foram 05 os animais positivos na reação, gerando uma prevalência de 3,70% (05/135) no grupo amostrado, sendo que 02 das amostras foram referentes a *swabs* cloacais, o equivalente a 1,50% (02/135), e 03 de *swabs* orofaríngeos, igual a 2,20% (03/135). Os achados dignos de nota no exame físico dos animais positivos na PCR em questão estão na Tabela 11, e seus respectivos resultados obtidos no hemograma e dosagens de bioquímica sérica na Tabelas 12 e 13. Todos eles apresentavam-se ativos e normohidratados. Os resultados obtidos foram comparados a valores de referência para as espécies, sendo que, na falta de dados, as espécies *Orthopsittaca manilata* e *Amazona ochrocephala* tiveram os seus dados comparados aos de *Amazona aestiva*, uma vez que todos eles são psitacídeos e possuem peso corporal compatíveis.



**Figura 8:** Resultado de PCR para detecção de *Mycoplasma spp.*; 1 - Marcador de peso molecular (100bp<sup>16</sup>); 2 - Controle positivo (vacina comercial<sup>17</sup>); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4 - *Orthopsittaca manilata* (31), 5 - *Anodorhynchus hyacinthinus* (100), 6 - *Amazona aestiva* (64), 7 - *Anodorhynchus hyacinthinus* (02); 8 - *Amazona ochrocephala* (51). Gel de agarose a 1,5% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

**Tabela 11:** Origem, número dentro do grupo de pesquisa, espécie, sexo, peso, condição de carnes, e respectivas amostras dos animais positivos na PCR para detecção de *Mycoplasma spp.* e IICRs.

Origem	Número	Espécie	Sexo	Peso	Cond. de Carnes	Amostra	IICR
G1	02	<i>A. hyacinthinus</i>	M	1440g	Normal	Swab Orofaringe	2
	31	<i>O. manilata</i>	F	370g	Obeso	Swab Orofaringe	2
	51	<i>A. ochrocephala</i>	M	430g	Obeso	Swab Cloacal	1
G2	100	<i>A. hyacinthinus</i>	M	1325g	Normal	Swab Orofaringe	2
	64	<i>A. aestiva</i>	M	400g	Normal	Swab Cloacal	2

Legenda: Fundação Jardim Zoológico (G1); Criadouro Conservacionista SpaZen (G2); Índice de Intensidade de Colonização Respiratória (IICR).

<sup>16</sup> 100bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>, E.U.A

<sup>17</sup> Mycovax® MS-H, Merial Saúde Animal, Campinas-SP, Brasil.

**Tabela 12:** Resultados obtidos no hemograma e dosagens de bioquímicas séricas dos animais 02 e 100 positivos na PCR para detecção de *Mycoplasma spp.*

Parâmetro	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>			
	02	100	VR	
Hemograma	VG (%)	45	49	43-53
	Hemácias ( $\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	2,90	3,60	2,90-3,40
	Hemoglobina (g/dL)	12,40	8,20	15,40-18
	Trombócitos ( $\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	17,75	28,92	NI
	PPT (g/dL)	3,10	4,10	2,70-3,60
	Leucócitos ( $\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	9,25	15,58	5,60-8,90
	Heterófilos (%)	71,30	78,14	58-78
	Linfócitos (%)	21,09	7,95	20-45
	Eosinófilos (%)	0,98	0	0-2
	Monócitos (%)	6,63	12,95	0-4
Basófilos (%)	0	0,96	0-4	
Bioquímicos	PT (g/dL)	1,80	3,00	3,60-7,00
	Albumina (g/dL)	0,70	0,80	NI
	AST (UI/L)	131	131	87-160
	FA (UI/L)	16	11	20-230
	Ácido Úrico (mg/dL)	12,50	5,80	3,40-10,40
	Creatinina (mg/dL)	0,10	0,20	0,30-0,50
	CK (UI/L)	97	170	260-563

Legenda: Volume globular (VG); Proteínas plasmáticas totais (PPT); Proteínas totais séricas (PT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatina cinase (CK); Amostra insuficiente (AI); Não informado (NI); Valores de referência (VR) para *A. hyacinthinus* (Godoy, 2006).

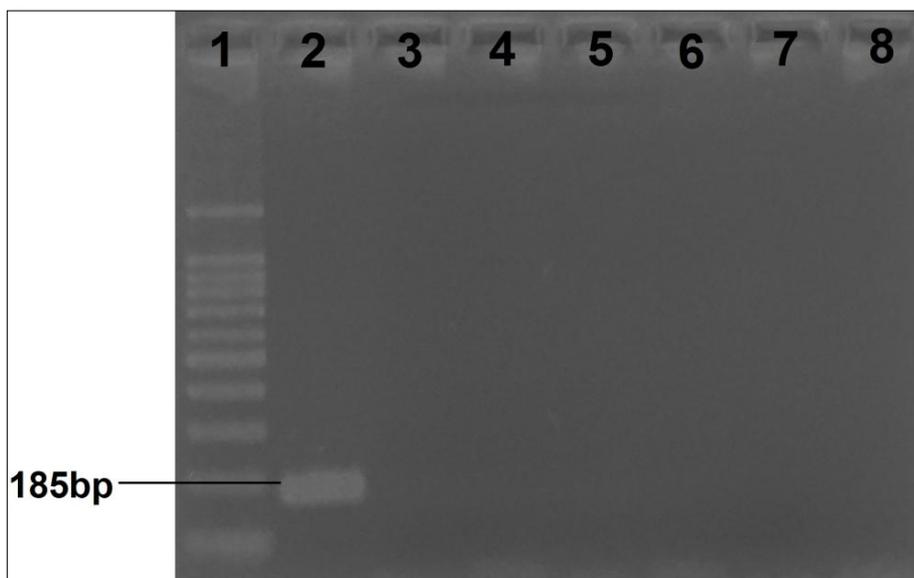
**Tabela 13:** Resultados obtidos no hemograma e dosagens de bioquímicas séricas dos animais 31, 51 e 64 positivos na PCR para detecção de *Mycoplasma spp.*

Parâmetro	<i>Amazona aestiva</i>				
	31	51	64	VR	
Hemograma	VG (%)	49	41	45	37 - 50
	Hemácias ( $\times 10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	3,10	2,50	3,00	2,40-4,00
	Hemoglobina (g/dL)	12,60	9,70	10,30	11,00-17,60
	Trombócitos ( $\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	47,71	21,10	23,76	NI
	PPT (g/dL)	4,20	4,00	4,80	3,00-5,00
	Leucócitos ( $\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$ )	46,76	10,40	15,23	4,60-11,00
	Heterófilos (%)	51,13	77,12	37,04	55-80
	Linfócitos (%)	30,92	17,98	20,00	20-45
	Eosinófilos (%)	0	0	0	0-1
	Monócitos (%)	17,95	1,92	39,01	0-3
Basófilos (%)	0	2,98	3,95	0-1	
Bioquímicos	PT (g/dL)	4,50	3,00	3,20	3,30-5,30
	Albumina (g/dL)	1,10	1,50	1,20	1,90-3,50
	AST (UI/L)	288	314	AI	130-350
	FA (UI/L)	38	32	AI	45-55
	Ácido Úrico (mg/dL)	5,70	3,60	AI	2,30-10
	Creatinina (mg/dL)	0,20	0,60	AI	0,10-0,40
	CK (UI/L)	170	24	AI	45-265

Legenda: Volume globular (VG); Proteínas plasmáticas totais (PPT); Proteínas totais séricas (PT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatina cinase (CK); Amostra insuficiente (AI); Não informado (NI); Valores de referência (VR) para *Amazona aestiva* (Godoy, 2006).

## 7. PCR DAS ESPÉCIES *M. GALLISEPTICUM* E *M. SYNOVIAE*

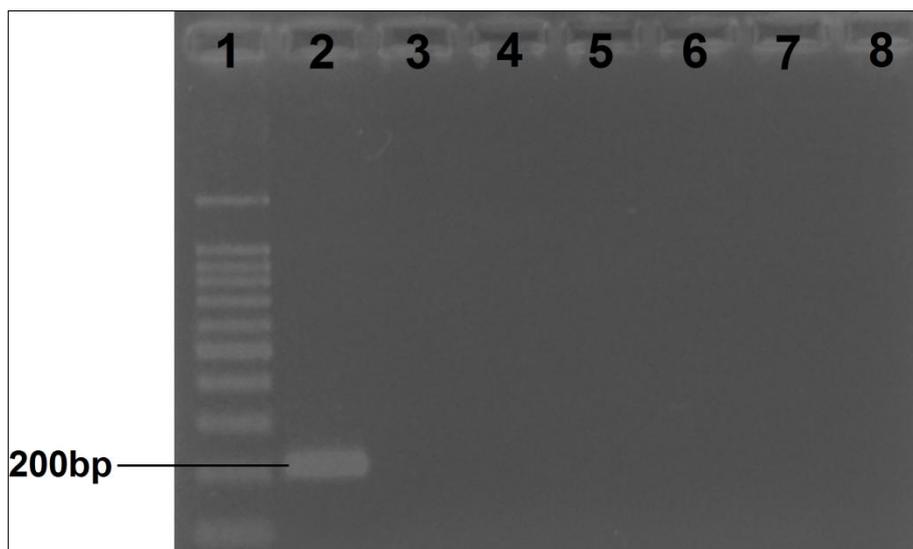
Para aqueles animais que foram positivos na PCR de detecção do gênero *Mycoplasma spp.*, foram realizadas as reações para detecção da espécie *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Durante a realização da PCR para detecção da espécie *M. gallisepticum*, obteve-se a amplificação do gene *16S rRNA*, a partir dos oligonucleotídeos JUG1 e JUG2, gerando o produto de 185bp apenas para amostra de controle positivo, sendo então todas as amostras das aves negativas para a reação (Figura 9). Enquanto na realização da PCR para detecção da espécie *M. synoviae*, obteve-se a amplificação do gene *16S rRNA*, a partir dos oligonucleotídeos JUS1 e JUS2, gerando o produto de 200bp também apenas para amostra de controle positivo, sendo então todas as amostras das aves negativas para a reação (Figura 10).



**Figura 9:** Resultado de PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*; 1 - Marcador de peso molecular (100bp<sup>18</sup>); 2 - Controle positivo (vacina comercial<sup>19</sup>); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4, 5, 6, 7 e 8 - Amostras negativas para *Mycoplasma gallisepticum*. Gel de agarose a 2,0% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

<sup>18</sup> 100bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>, E.U.A

<sup>19</sup> Mycovax® TS-11, Merial Saúde Animal, Campinas-SP, Brasil.



**Figura 10:** Resultado de PCR para detecção de *Mycoplasma synoviae*; 1 - Marcador de peso molecular (100bp<sup>20</sup>); 2 - Controle positivo (vacina comercial<sup>21</sup>); 3 - Controle negativo (água miliQ); 4, 5, 6, 7 e 8 - Amostras negativas para *Mycoplasma synoviae*. Gel de agarose a 2,0% (p/v) corado por brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

## DISCUSSÃO

Ao avaliar os valores obtidos das análises hematológicas das aves, não foram achados valores significativos entre machos e fêmeas, mas foram encontradas diferenças significativas entre os criadores no que se diz respeito aos valores de contagem total do número de hemácias e concentrações de hemoglobina, AST e ácido úrico. A diferença estatística observada na contagem total de hemácias e concentração de hemoglobina pode ser explicada quando leva-se em consideração as diferenças dos recintos em que as aves são criadas. Os recintos da Fundação Jardim Zoológico são mais altos e mais amplos e possuem densidade populacional mais baixa do que do Criadouro Conservacionista Spa Zen. Animais que possuem maior atividade física podem apresentar maior número de hemácias e maior concentração de hemoglobina nas mesmas, além do que, a excitabilidade e o esforço físico, durante o processo de captura manual, podem causar eritrocitose relativa e estimulação da liberação de glóbulos vermelhos, sem que sinais clínicos sejam notados (Swenson, 1996; Randolph et al., 2010). A diferença nas concentrações de AST entre os criadores pode estar associada ao manejo ou a algum tipo de infecção presente na população amostrada que está sendo

<sup>20</sup> 100bp DNA Ladder®, Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>, E.U.A

<sup>21</sup> Mycovax® MS-H, Merial Saúde Animal, Campinas-SP, Brasil.

responsável por danos aos tecidos hepático, cardíaco ou muscular. Apesar da concentração ter se mostrado diferente entre os criadouros, se manteve dentro da normalidade, de acordo com valores de referências para as aves (Campbell, 2006). O ácido úrico, que é produzido no fígado e rins, é o principal indicador de doença renal em aves, mas seus valores podem variar de acordo com outros fatores, como por exemplo a dieta alimentar. Ter obtido diferença estatística, na mensuração da concentração deste catabólito, entre os criadores pode ser indicativo de que alguma doença, que cause lesão renal, pode estar presente no grupo ou estar relacionado apenas à diferença entre as dietas. Embora os dois tipos de dietas oferecidos aos animais, uma em cada criador, sejam adequadas, a da Fundação Jardim Zoológico possuía uma diversidade maior de constituintes. A ingestão de maior quantidade de proteína, dos animais da Fundação Jardim Zoológico pode ter levado à diferença obtida, uma vez que a média foi maior na mesma (Almosny e Monteiro, 2006; Campbell, 2006).

O *swab* traqueal desenvolvido pela equipe mostrou-se ser de fácil fabricação e manuseio, baixo custo, e permitiu que o material biológico traqueal fosse coletado sem que ocorresse qualquer tipo de complicação para o animal durante o processo de coleta, como por exemplo apneia ou dispneia, que já foram descritas por Gerlach (1994) e Redig (2008). Das bactérias que foram isoladas neste trabalho, analisando-se uma a uma, nota-se que todas elas são bactérias que já foram isoladas de aves e descritas em literatura, como sendo comensais de membranas mucosas de cavidade oral, trato respiratório e trato gastrintestinal de animais (Quinn et al., 1994; 2005; Tully, 1995; Zwart, 2008). Quando analisamos a presença de leveduras, e a prevalência das mesmas dentro do grupo (51,6%; Tabela 7), também vai de encontro ao descrito por Biasia e Giovanardi (2001) e Silvanose (2008), de que leveduras podem ser isoladas de trato respiratório inferior de aves aparentemente saudáveis. Fazendo a análise dos fungos isolados, nota-se que todos eles são fungos ambientais, e podem ser facilmente encontrados no ambiente, como solo e plantas (Quinn et al., 1994; 2005).

Dos resultados obtidos na cultura microbiológica nota-se que a maioria dos animais apresentou pelo menos um microrganismo isolado de seu respectivo trato respiratório inferior, e apenas 05 indivíduos, 4,17% (05/120), não apresentaram qualquer crescimento, demonstrando que é normal a presença de microrganismos

nas vias aéreas inferiores. Do grupo de bactérias isoladas, analisando-se os gêneros e espécies, o nosso trabalho obteve resultados congruentes com os encontrados por Akhter et al. (2010), ao fazer cultivo bacteriano de material traqueal de psitacídeos assintomáticos de cativeiro. Quando analisamos o percentual de animais, pertencentes aos dois criadouros, distribuídos entre os IICRs a que foram atribuídos (Tabela 8), nota-se que a maior parte dos animais teve de 02 a 05 diferentes tipos de microrganismos isolados de seu trato respiratório inferior, seguido daqueles que tiveram 00 ou 01 tipo; e a minoria, que foram aqueles que tiveram 06 ou 07 tipos. De acordo com Zwart (2008), animais de cativeiro estão comumente expostos a bactérias, fungos e outros tipos de microrganismos, que estão presentes em seu ambiente. A contaminação pode ocorrer através da comida, água, fômites, e até pelo contato com os outros animais.

A maior parte dos animais apresentou 02 a 05 tipos de microrganismos na cultura microbiológica sem que tenha tido qualquer tipo de alteração clínica de caráter respiratório em seu exame clínico. As análises estatísticas realizadas mostraram que não há diferença estatística entre o número de agentes isolados do trato respiratório inferior entre machos e fêmeas ou entre os criadouros. Logo, a condição de higiene dos criadouros e nem o sexo dos indivíduos foram fatores determinantes no número de agentes microbiológicos isolados do trato respiratório inferior, outros aspectos devem estar envolvidos. Em concordância ao encontrado em literatura, notamos que a presença dos agentes infecciosos não necessariamente vão causar doença nos hospedeiros, existem vários fatores individuais e ambientais que desencadeiam o processo de doença (Godoy, 2006; Zwart, 2008). Porém, se obteve diferença estatística ( $p=0,03$ ) na concentração de albumina sérica quando usado o IICR como fator (Figura 6). A concentração de albumina sérica foi menor naquele grupo de maior quantidade de microrganismos isolados (IICR 3), provavelmente por se tratar de uma proteína de fase aguda negativa, em que sua concentração se reduz durante processo infeccioso ou inflamatório (Eckersall, 2008).

Na PCR para sexagem das aves, os genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* foram amplificados e resultaram em produtos de aproximadamente 450bp e 650bp, respectivamente (Figura 7), obtendo-se a diferença de tamanho de 200bp entre eles. A reação ocorreu conforme esperado por Quintana et al. (2008). Sabe-se que há

uma pequena variação entre o peso molecular, dos produtos resultantes, entre as diferentes espécies de aves, o que foi mostrado por Fridolfsson e Ellegren (1999) e observado no presente trabalho, porém sempre respeitando a relação de 200bp de diferença entre os pesos moleculares dos dois produtos obtidos, independente da espécie aviária. A técnica da PCR foi capaz de fazer a sexagem de todos os indivíduos de todas as espécies de nosso trabalho.

Inicialmente a PCR para a detecção de *Mycoplasma spp.* foi utilizada em nosso trabalho com o propósito de funcionar como triagem de animais positivos, para depois serem direcionadas às análises das espécies de MG e MS, que já foram identificadas em psitacídeos de cativeiro no Brasil (Gomes et al., 2010; 2012). O presente trabalho demonstrou que existe a presença de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos mantidos em cativeiro no DF, Brasil, uma vez que se obteve amostras positivas de 05 animais de dois criadouros distintos, por meio da PCR capaz de detectar *Mycoplasma spp.*, obtendo-se prevalência igual a 3,70% (05/135). Lierz e Hafez (2009) também investigaram a ocorrência de *Mycoplasma spp.* em diferentes espécies de psitacídeos de cativeiro na Alemanha, sendo que obtiveram 25% (06/24) de amostras positivas em um grupo de 24 indivíduos que apresentavam sinais clínicos de doença respiratória. Fizeram o mesmo teste diagnóstico em outros 40 indivíduos psittaciformes, assintomáticos, e não obtiveram animais positivos, sendo o teste em questão PCR a partir de *swabs* de coana e traqueia. Nossos resultados, quando comparados ao de Lierz e Hafez (2009) são divergentes, porém deve-se levar em conta que naquele grupo dos assintomáticos, que é o que mais se assemelha ao grupo dos animais amostrados em nosso trabalho, o número total de indivíduos foi menor do que o nosso, a sensibilidade da PCR pode ter sido diferente, e outra, não se tem informações referentes ao histórico dos animais, nem do ambiente em que os mesmos são mantidos e que se trata de localidades geográficas bem distintas. Outras informações teriam de ser comparadas para que se fizesse um perfeito estudo da prevalência.

As amostras positivas para o gênero *Mycoplasma spp.* também foram testadas em outras duas PCRs distintas capazes de detectar a presença de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Nas duas PCRs não obtivemos amostras positivas. Os resultados negativos para MG e MS não foram os mesmos encontrados por Gomes et al. (2010), em que foi identificada a presença de MG em 6,1% das amostras

obtidas de psitacídeos que vieram a óbito por diversas causas, no estado de Minas Gerais, e nem por Gomes et al. (2012), que identificou a coinfeção de MG e MS em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) sintomático de cativeiro também no estado de Minas Gerais, Brasil. Ambos os trabalhos testaram *swabs* de orofaringe e cloaca, e utilizaram a mesma técnica diagnóstica que nesta pesquisa (OIE, 2008). Não ter encontrado animais positivos para MG e MS neste trabalho, diferente dos outros dois citados, pode ser explicado devido à aleatoriedade com que foi feita a amostragem dos nossos indivíduos, e mais, nenhum dos animais apresentavam-se sem qualquer alteração clínica digna de nota. No trabalho de Gomes et al. (2010) foram testados apenas animais que já estavam mortos, e Gomes et al. (2012) amostrou apenas um indivíduo, sendo que o mesmo já apresentava sinais clínicos da doença e foi encaminhado para a clínica veterinária por este motivo. Uma vez que não sabemos as condições em que os animais que foram amostrados nos trabalhos citados eram criados, dos nossos animais podemos dizer que seus recintos eram semi cobertos, e recebiam incidência de raios solares a maior parte do dia, além da higiene mínima realizada, uma vez que nenhum dos dois criadouros recebeu qualificação ruim sanitariamente. Sabe-se que os micoplasmas, por não possuírem parede celular, são bastante sensíveis no ambiente (Nascimento, 2000). O número maior de animais positivos na Fundação Jardim Zoológico (04 indivíduos) e menor do Criadouro Conservacionista Spa Zen (01 indivíduo) pode ser explicado devido ao número total de animais que foram amostrados, que foi maior no Jardim Zoológico que no criadouro Spa Zen, e outra, o animal positivo do criadouro Spa Zen pode ser recente em seu grupo, uma vez que os animais criados na propriedade eram advindos do IBAMA e não se tinha o controle da data de entrada e saída dos mesmos. Uma vez recém chegado, talvez ainda não tivesse dado tempo de contaminar os demais.

O resultado das amostras positivas apenas para o gênero *Mycoplasma spp.* leva a crer que as espécies que foram identificadas na PCR possam ser outros tipos de micoplasmas, além do MG e MS, capazes de infectar psittaciformes. A afirmação pode ser verdadeira uma vez que existem relatos de espécies de micoplasmas, como *M. cloacale*, *M. iowae*, e outras que não foram identificadas, que já foram isoladas de psittaciformes pelo mundo (Bozeman et al., 1984; Bradbury et al., 1987). Outra hipótese também pode ser de que as espécies identificadas possam ser

mutações de MG e MS e que não foram amplificadas a partir das sequências de oligonucleotídeos utilizadas no presente trabalho, fazendo necessário a realização de posteriores técnicas de sequenciamento do material genético amplificado para identificação das espécies em questão. O número de trabalhos ainda é escasso com relação a outras espécies de micoplasmas, além de MG e MS, capazes de infectar psitacídeos.

Não houve nenhum parâmetro hematológico, através das análises estatísticas, que tenha sido alterado naqueles animais em que foi diagnosticada a presença do agente *Mycoplasma spp.*, o que pode ser explicado pelo baixo número de infectados dentro da população amostrada, ou pela baixa patogenicidade do micoplasma isolado. Apesar de se apresentarem clinicamente saudáveis, ativos, normohidratados e condição de carnes normais ou obesos, no dia da colheita do material biológico, os animais positivos apresentaram pelo menos uma alteração digna de nota em seus exames hematológicos. Os animais 100, 31 e 64 apresentaram nítida leucocitose acompanhada de monocitose. Este resultado em aves geralmente está associado a processos infecciosos e inflamatórios (Almosny & Monteiro, 2006). O animal 64 demonstrou ainda aumento da contagem de basófilos. O basófilo é uma das primeiras células a participar da resposta inflamatória aguda ou reação de hipersensibilidade (Campbell, 2006; Clark et al., 2009). As leucocitoses obtidas podem ser em razão da infecção pelo micoplasma ou por qualquer outro tipo de agente. As araras número 02 e 100, ambas *A. hyacinthinus*, e os papagaios verdadeiros, 51 e 64, apresentaram concentração de PT menor do que a esperada para a espécie, o que pode ser explicado uma vez que os quatro indivíduos são machos e adultos. Machos consomem grande quantidade de proteína para a manutenção dos caracteres secundários masculinos, como hipertrofia muscular e coloração das penas (Meadows et al., 2012). A arara 02 ainda apresentou elevada concentração de ácido úrico. O ácido úrico é principal catabólito do metabolismo do nitrogênio nas aves, sendo ele produzido no fígado e nos rins e varia em função da idade e dieta (Campbell, 2006). Por se tratarem de iguais espécies, sexo, adultos e de receberem a mesma dieta, o aumento encontrado em 02, o que foi normal para 100, sugere que o indivíduo 02 possa estar com alguma doença renal. Os animais 31, 51 e 64 apresentaram discreta diminuição na concentração de albumina, e como

dito anteriormente, tal resultado pode estar relacionado ao processo infeccioso causado pelo micoplasma (Eckersall, 2008).

Quando analisados individualmente, alguns dos animais que foram positivos para *Mycoplasma spp.* apresentaram alterações em seus exames hematológicos típicos de serem associados a processos infecciosos e inflamatórios. A maioria apresentou IICR 2 e apenas 1 apresentou IICR 1 (Tabela 11), assim como observado na população amostrada. Como discutido anteriormente, micoplasmoses possuem baixo índice de mortalidade. Os sinais clínicos variam muito de acordo com a espécie e com os desafios ambientais a que o indivíduo é submetido, em especial a exposição a microrganismos oportunistas (Cavalheiro, 2001; Murakami et al., 2002). A ausência de sinais clínicos, observada nos mesmos, na data da colheita pode ser devido à baixa patogenicidade do micoplasma, pela pequena quantidade de agentes isolados do trato respiratório inferior, uma vez que nenhum foi classificado como IICR 3, ou ainda, pelas condições de higiene, alimentares e de densidade populacional em que os mesmos são criados (Tabela 5), que eram mínimas, adequadas e moderadas, respectivamente.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do presente estudo, permitiram concluir que:

- O sexo dos animais não interferiu estatisticamente nos parâmetros de saúde avaliados e nem no IICR;
- Os criadouros não interferiram na IICR. Porém, interferiram em alguns parâmetros hematológicos devido às diferenças dos manejos das aves;
- Existe a presença de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de cativeiro do DF, Brasil, sendo esta de baixa prevalência;
- Os animais positivos para *Mycoplasma spp.* foram negativos para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, indicando que possivelmente outras espécies de micoplasmas, capazes de infectar psitacídeos, estejam presentes no DF;
- Os animais positivos para *Mycoplasma spp.* apresentavam-se assintomáticos na época da colheita de material biológico, e com algumas alterações em seus leucogramas que pudessem estar associadas à infecção pelo agente em questão;

- A grande maioria dos animais amostrados teve pelo menos um microrganismo isolado de seu trato respiratório inferior sem que apresentasse qualquer sinal clínico de caráter respiratório. Porém, naqueles com maior quantidade de microrganismos isolados, foi notada hipoalbuminemia;
- O isolamento de um agente infeccioso não quer dizer doença instalada, vários outros aspectos ambientais e individuais devem estar envolvidos no quadro de morbidade.

## REFERÊNCIAS

ALLGAYER, M.C., CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 344-350, 2007.

ALMOSNY, N.R.P. e MONTEIRO, A.O. Patologia clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 1ª Edição, 2006. 951p.

BAILEY, T.A. Capture and Handling. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

BIASIA, I., GIOVANARDI, A.A. Fungal Infections - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

BOZEMAN, L.H., KLEVEN, S.H., DAVIS, R.B. *Mycoplasma* Challenge Studies in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Chickens. **Avian Diseases**, v. 28, n. 02, p. 426-434, 1984.

BRADBURY, J.M., VUILLAUME, A., DUPIELLET, J.P., FORREST, M., BIND, J.L., GAILLARD-PERRIN, G. Isolation of *Mycoplasma cloacale* from a number of different avian hosts in Great Britain and France. **Avian Pathology**, v. 16, p. 183-186, 1987.

CAMPBELL, T.W. **Avian Hematology and Cytology**. Ames: Iowa State University Press, 2ª Edição, 1995. 104p.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica das Aves. In: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. 472p.

CAVALHEIRO, M.L. Miscellaneous diseases - Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1ª Edição, 2001. 536p.

CLARK, P., BOARDMAN, W.S.J., RAIDAL, S.R. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Ames: Blackwell Publishing, 1ª Edição, 2009. 184p.

CLUBB, S.L., FLAMMER, K. The Avian Flock. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth: Wingers Publishing, Inc., 1994. 1384p.

ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSSA, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 6ª Edição, 2008.

FRIDOLFSSON, A.K., ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology**, v. 30, p. 116-121, 1999.

GARCIA, M., IKUTA, N., LEVISOHN, S., KLEVEN, S.H. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Avian Diseases**, v. 49, n. 1, p. 125-132, 2005.

GERLACH, H. Mycoplasma and Rickettsia. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth: Wingers Publishing Inc., 1994. 1384p.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 1ª Edição, 2006. 951p.

GOMES, A.M., COSTA, L.L., VILELA, D.A.R., MARQUES, M.V.R., CARVALHAES, A.G., MARIN, S.Y., COSTA, M.P., HORTA, R.S., RESENDE, J.S., MARTINS, N.R.S.

Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Agrícola**, v. 12, n. 2, p. 75-78, 2010.

GOMES, A.M., ORTIZ, M.C., CARVALHAES, A.G., MARTINS, N.R.S. *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) com doença respiratória - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, n. 98, 2012.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H., NOZAWA, K., NAKAGAWA, T., ASADA, K., KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. **Research in Microbiology**, v. 144, p. 489-493, 1993.

HOWLETT, J.C. Ectoparasites. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 27, p. 07-14, 1998.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12ª Edição, 2008. 1260p.

LAUERMAN, L.H., HOERR, F.J., SHARPTON, A.R., SHAH, S.M., SANTEN, V.L. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v. 37, n. 3, p.829-834, 1993.

LAWTON, M.P.C. Anesthesia and soft tissue surgery. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

LEVY, H., HORAK, D.A., TEGTMEIER, B.R., YOKOTA, S.B., FORMAN, S.J. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. **Respiratory Medicine**, v. 86, p. 243-248, 1992.

LEY, D.H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M., FADLY, A.M., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 12ª Edição, 2008. 1260p.

LIERZ, M., HAFEZ, H.M. *Mycoplasma* species in psittacines birds of respiratory disease. **Veterinary Record**, v. 164, p. 629-630, 2009.

LUTTRELL, P., FISCHER, J.R. Mycoplasmosis. In: THOMAS, N.J., HUNTER, D.B., ATKINSON, C.T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Ames: Blackwell Publishing, 1ª Edição, 2007. 484p.

MEADOWS, M.G., ROUDYBUSH, T.E., MCGRAW, K.J. Dietary protein level affects iridescent coloration in Anna's hummingbirds, *Calypte anna*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 2742-2750, 2012.

MURAKAMI, S., MIYAMA, M., OGAWA, A., SHIMADA, J., NAKANE, T. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. infection. **Avian Pathology**, v. 31, p. 363-370, 2002.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, .A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

NAKAGAWA, T., UEMORI, T., ASADA, K., KATO, I., HARASAWA, R. *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 24, p. 8163-8165, 1992.

OIE, WORLD ORGANISATION OF ANIMAL HEALTH. Chapter 2.3.5. - Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In: OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)**. Paris: OIE, 2008.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Dublin: Wolfe, 1ª Edição, 1994. 648p.

QUINN, P.J., MARKEY, B., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

QUINTANA, F., LÓPEZ, G.C., SOMOZA, G. A cheap and quick method for DNAbased sexing of birds. *Waterbirds*, v. 31, n. 3, p. 485-488, 2008.

RANDOLPH, J.F., PETERSON, M.E., STOKOL, T. Erythrocytosis and Polycytemia. In: WEISS, D.J., WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames: Blackwell Publishing, 6ª Edição, 2010. 1206p.

REDIG, P. Fungal diseases - Aspergilosis - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

ROSSI JR., J.L. Técnicas de Captura e Contenção Físico-química. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 1ª Edição, 2006. 951p.

SALLE, C.T.P., SILVA, A.B. Prevenção de Doenças/Manejo Profilático/Monitoração. In: BERCHIERI JUNIOR, .A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

SAMOUR, J. Clinical Examination. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

SILVANOSE, C. Fungal diseases - Candidiasis - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2ª Edição, 2008. 525p.

SUNG, H., KANG, S.H., BAE, Y.J., HONG, J.T., CHUNG, Y.B., LEE, C., SONG, S. PCR-Based detection of mycoplasma species. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-49, 2006.

SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue. In: SWENSON, M.J, REECE, W.O. **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 11ª Edição, 1996. 856p.

TULLY, T.N.Jr. Avian Respiratory Diseases: Clinical Overview. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 9, n. 3, p. 162-174, 1995.

XAVIER, M.O., OLIVEIRA, F.M., SEVERO, L.C. Continuing Education Course - Mycoses. Chapter 1 - Laboratory diagnosis of pulmonary mycoses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 907-919, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. Illinois: Prentice Hall, 5ª Edição, 2010. 944p.

ZWART, P. Bacterial diseases - Infectious diseases. In: Samour, J. **Avian Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2<sup>a</sup> Edição, 2008. 525p.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredita-se que este presente trabalho, em que foi encontrada a presença do agente *Mycoplasma spp.* em psitacídeos assintomáticos de cativeiro no Distrito Federal, contribuirá com futuros estudos referentes ao agente e à infecção dos animais em questão no Brasil. Contudo, considerando a escassez de informações e pesquisas referentes a micoplasmoses em psitacídeos no Brasil e no mundo, existe a necessidade de que mais estudos sejam feitos com relação à distribuição, transmissão, patogenia, manifestação clínica e patologia clínica dessa doença. Necessidade esta quando lembramos que os psitacídeos são aves abundantes na fauna brasileira, e que dentro do grupo possuímos espécies que estão ameaçadas de extinção. Saber mais sobre a ocorrência do agente neste grupo contribuirá com aspectos relacionados à conservação das espécies.

Outra contribuição do presente trabalho foi a confirmação de que as aves, assim como outros animais, hospedam agentes microbiológicos em seu trato respiratório inferior com frequência, sem que os mesmos estejam causando doença. A instalação e desenvolvimento da doença e dos sinais clínicos vão estar associados aos desafios ambientais aos que os mesmos forem submetidos. A identificação por si só do agente infeccioso não significa que a doença esteja instalada.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### **i. Resumo expandido publicado em anais de Congresso Nacional**

Neves, J. P.; Assis, A. Z.; Santos, R. S. T.; Perecmanis, S.; Monteiro, R. V. Análise microbiológica do trato respiratório inferior de papagaios (*Amazona aestiva* e *Alipiopsitta xanthops*) por meio de lavado transtraqueal. In: XIV Congresso e XX Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens - ABRAVAS, 2011. p. 139-141.

## ANEXO II

### i. Ilustração cópia da ficha clínica de avaliação individual de coletas de dados referentes aos animais estudados.

Ilustração II.1. Ficha de avaliação clínica individual (Arquivo pessoal).

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA INDIVIDUAL			
<b>GERAL</b>			
Número do Animal: _____			Data: _____
Faixa Etária: _____	<input type="checkbox"/> Jovem	<input type="checkbox"/> Adulto	Peso: _____
Espécie: _____			
Identificação Individual: _____			
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Indet.		Criadouro: _____	
Origem: _____	Tempo no Criadouro: _____	No. Recinto: _____	
<b>PROTOCOLO ANESTÉSICO</b>			
Fármaco: _____	Dose: _____	Via: _____	
Transcurso Anestésico: _____	<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Razoável	<input type="checkbox"/> Ruim
Recuperação Anestésica: _____	<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Razoável	<input type="checkbox"/> Ruim
<b>RECINTO</b>			
No. Animais: _____	Cond. Sanitária: _____	<input type="checkbox"/> Sujo	<input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Limpo
	<input type="checkbox"/> Gaiola Peg.	<input type="checkbox"/> Gaiola Grande	<input type="checkbox"/> Gaiolão <input type="checkbox"/> Gaiola de Reprod.
	<input type="checkbox"/> Incubadora	<input type="checkbox"/> Outro: _____	
	<input type="checkbox"/> Coberto	<input type="checkbox"/> Parcialmente Coberto	<input type="checkbox"/> Descuberto
Tipo	<input type="checkbox"/> Piso Natural	<input type="checkbox"/> Piso Artificial	Tipo: _____
	<input type="checkbox"/> Sem Poleiros	<input type="checkbox"/> Com Poleiros	Tipo: _____
	<input type="checkbox"/> Sem Comedouros	<input type="checkbox"/> Com Comedouros	Tipo: _____
	<input type="checkbox"/> Sem Bebedouros	<input type="checkbox"/> Com Bebedouros	Tipo: _____
<b>EXAME FÍSICO</b>			
Aparência Geral: _____	<input type="checkbox"/> Doente	<input type="checkbox"/> Saudável	
Atitude: _____	<input type="checkbox"/> Ativo	<input type="checkbox"/> Quietos	<input type="checkbox"/> Irresponsivos
Comportamento: _____	<input type="checkbox"/> Dócil	<input type="checkbox"/> Indócil	
Cond. de Carnes: _____	<input type="checkbox"/> Muito Magro	<input type="checkbox"/> Magro	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Obeso
Hidratação: _____	<input type="checkbox"/> Desidratado		<input type="checkbox"/> Normoidratado
Palpação Hepática: _____	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Pouco Aumentado	<input type="checkbox"/> Muito Aumentado
Ectoparasitas: _____	<input type="checkbox"/> Nenhum	<input type="checkbox"/> Poucos	<input type="checkbox"/> Muitos Local e Tipo: _____
Empenamento	Cobertura: _____	<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Ruim
	Qualidade:	Aparência: _____	<input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Ruim
		Cor: _____	<input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Ruim
Alterações	Tegumentar: _____		
	Bucco Facial: _____		
	Ocular: _____		
	Locomotor: _____		
	Respiratório: _____		
Digestório: _____			
Neurológico: _____			
<b>INFORMAÇÕES</b>			
Dieta / Suplementações: _____			
Vermifugação: _____			
Vacinação: _____			
<b>PROCEDIMENTOS REALIZADOS</b>			
Coleta de Sangue: _____	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Quantidade: _____	<input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Bioquímicos
Ectoparasitas: _____	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Tipo: _____	Fezes: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Swabs: _____	<input type="checkbox"/> Cloacal	<input type="checkbox"/> Traqueal	<input type="checkbox"/> Orofaringe

ii. Ilustrações referentes ao *swab* desenvolvido e fabricado pelo grupo de pesquisadores para realizar a coleta de material biológico traqueal de aves menores que 1000g.

Ilustração II.2. Ponta de papel absorvente descartável de uso odontológico, número 60 (Tanari®, Tanariman Indústria Ltda.; Arquivo pessoal).

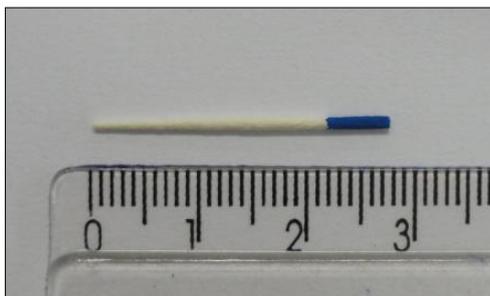


Ilustração II.3. Agulha hipodérmica 1,20x40mm, descartável (PrecisionGlide®, Becton Dickinson and Company) com a extremidade perfuro cortante desgastada (Arquivo pessoal).

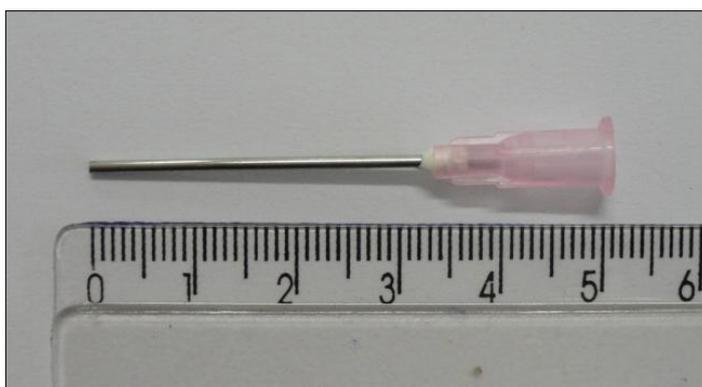
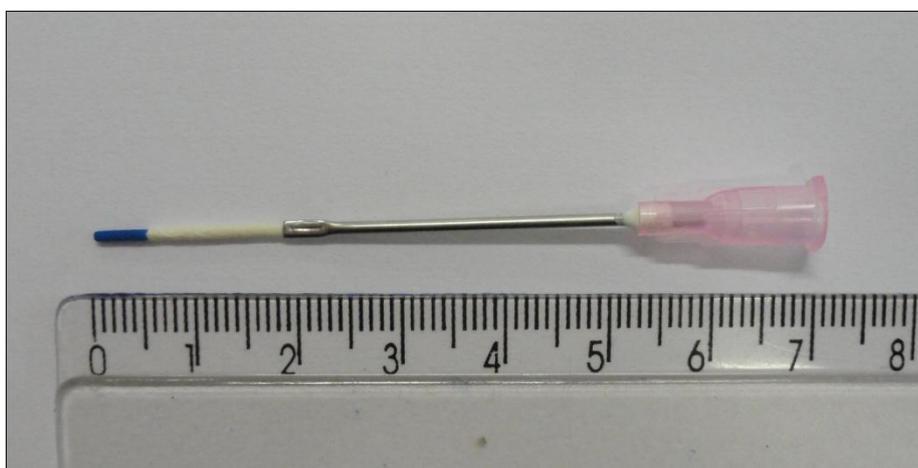


Ilustração II.3. *Swab* traqueal pronto para ser autoclavado e utilizado, após união manual com o auxílio de um alicate de pressão (Arquivo pessoal).



### ANEXO III

#### i. Protocolos de formulação dos meios de cultura e meios de transporte de amostras biológicas.

Tabela III.1. Tabela com a descrição e quantidade dos reagentes utilizados na formulação do meio PBS ("*Phosphate Buffered Saline*" - Solução Salina Tamponada com Fosfato, pH final =  $7,4 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ; Bio-ITech Laboratory Information Management).

Reagente	Quantidade
dH <sub>2</sub> O	800mL
NaCl	08g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g

Tabela III.2. Tabela com a descrição e quantidade dos reagentes utilizados na formulação do meio BHI ("*Brain Heart Infusion*" - Infuso de Cérebro e Coração, pH final =  $7,4 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ; Biobrás S/A).

Reagente	Fórmula g/L
Peptona de Gelatina	10,5
Infuso de Cérebro e Coração	6,0
Peptona de Carne	11,0
Glicose	2,0
Cloreto de Sódio	5,0
Fosfato Dissódico	2,5

Tabela III.3. Tabela com a descrição e quantidade dos reagentes utilizados na formulação dos meios de cultura: Ágar Sangue (pH final =  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ; HiMedia Laboratories PVD Ltda.) e Ágar Dextrose Sabouraud (pH final =  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ; Thermo Fisher Scientific Inc.).

Meio de Cultura	Reagente	Fórmula g/L
Ágar Sangue	Infusão de Coração de Boi	500,0
	Triptose	10,0
	Cloreto de Sódio	5,0
	Ágar	15,0
Ágar Dextrose Sabouraud	Peptona Micológica	10,0
	Glicose	40,0
	Ágar	15,0

#### ii. Descrição dos ensaios e princípios utilizados para análise de bioquímica sérica.

Tabela III.4. Protocolos das dosagens de bioquímica sérica segundo recomendações do fabricante (Labtest Diagnóstica®).

Ensaio	Princípio
<b>Hemoglobina</b>	O Fe (II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), o qual é medido em 540nm.
<b>Proteínas Totais</b>	Os íons cobre ( $Cu^{+2}$ ) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.
<b>Albumina</b>	A albumina tem a propriedade de se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração de 6,0g/dL.
<b>AST/GOT Liquiform</b>	A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglurato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada à NAD. A redução da absorvância em 340nm, conseqüente à oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.
<b>FA Colorimétrico</b>	A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional a atividade enzimática, é medida em 590 nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.
<b>Ácido Úrico Liquiform</b>	O ácido úrico é oxidado pela uricase à alantoina e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase, reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.
<b>Creatinina</b>	A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.
<b>CK - NAC</b>	A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) é oxidada a fosfogluconato(6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK na amostra.

### iii. Descrição das chaves de identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela III.5. Chave básica de identificação de bactérias Gram-Positivas (Quinn et al., 2005).

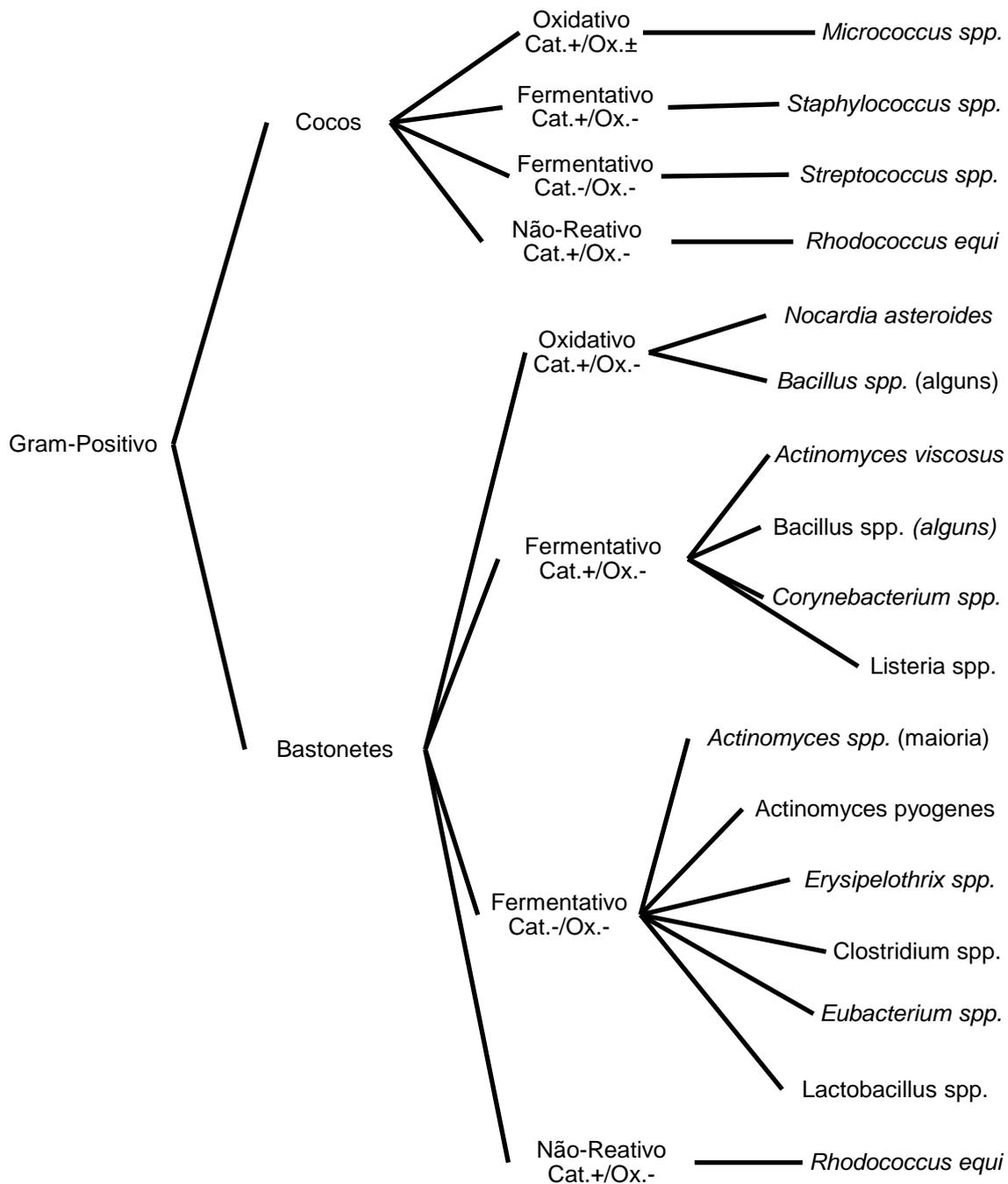
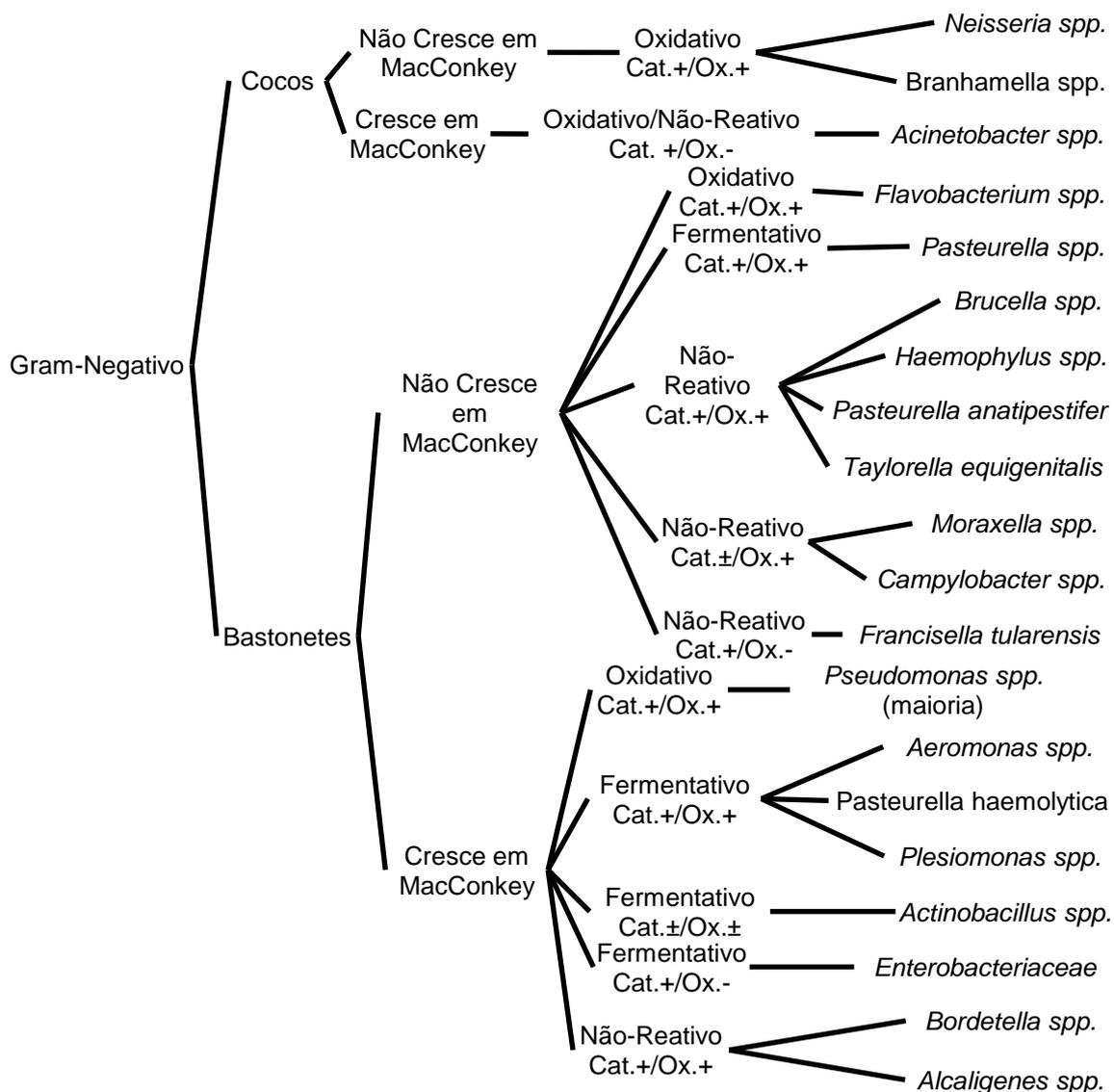


Tabela III.6. Chave básica de identificação de bactérias Gram-negativas (Quinn et. al, 2005).



**iv. Tabelas de testes bioquímicos utilizados na diferenciação entre grupos de bactérias.**

Tabela III.7. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Actinomyces spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Listeria spp.* (Quinn et al., 2005).

Teste	<i>A. spp.</i>	<i>B. spp.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>L. spp.</i>
Motilidade	Neg.	Pos. Neg. ( <i>B. anthracis</i> )	Neg.	Pos.
Nitrato	Pos. Neg. ( <i>A. bovis</i> )	Pos.	Var.	Neg.
Gelatina	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
Urea	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.
Esculina			Neg.	Pos.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável.

Tabela III.8. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Aeromonas spp.*, *Pasteurella spp.*, *Plesiomonas spp.* e *Actinobacillus spp.* (Quinn et al., 2005).

Teste	<i>A. spp.</i>	<i>P. spp.</i>	<i>P. spp.</i>	<i>A. spp.</i>
Motilidade	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Lisina	Pos.	Neg.	Pos.	
Ornitina	Neg.		Pos.	
Indol	Pos.	Neg. Pos. ( <i>P. multoc./pneum.</i> )	Pos.	Neg.
Urea	Pos.	Neg. Pos. ( <i>P. pneu./aero./ureae.</i> )	Neg.	Pos.
Gelatina	Pos.	Neg.	Neg.	
H <sub>2</sub> S		Neg.		Pos. Neg.
Arabinose	Pos.		Neg.	Pos. ( <i>A. suis</i> )
Sacarose	Pos.	Pos. Neg. ( <i>P. anatipestifer</i> )	Neg.	Pos.
Esculina	Pos.		Neg.	

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.9. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Actinomyces spp.* e *Nocardia spp.* (Quinn et al., 2005).

Teste	<i>Actinomyces spp.</i>	<i>Nocardia spp.</i>
Atmosfera	Anaeróbio ou Microaeróbio	Aeróbio
Oxidação/Fermentação	Fermentativo	Oxidativo
Catalase	Negativo Positivo ( <i>A. viscosus</i> )	Positivo
Crescimento em Sabouraud	Negativo	Positivo
Ácido Resistência	Negativo	Positivo
Susceptibilidade à Penicilina	Sensível	Resistente

Tabela III.10. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Brucella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Pasteurella anatipestifer*, *Taylorella spp.*, *Moxarella spp.* e *Campylobacter spp.* (Quinn et al., 2005).

Teste	<i>B. spp.</i>	<i>H. spp.</i>	<i>P. anatipestifer</i>	<i>T. spp.</i>	<i>M. spp.</i>	<i>C. spp.</i>
Atmosfera	Aer./Micro.	Aer./Micro.	Aer./Anae.	Micro.	Aer.	Micro.
Motilidade	Neg. Pos.	Neg. Neg.	Neg.	Neg.	Neg. Var.	Pos.
Urea	Neg. ( <i>B. ovis</i> )	Pos. ( <i>H. pleuro.</i> )	Neg.	Neg.	Neg. ( <i>M. bovis</i> ) Var.	Neg.
Nitrato	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg. ( <i>M. bovis</i> )	Pos.
Glicose		Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	

Legendas: Aer.-Aeróbio; Micro.-Microaeróbio; Anae.-Anaeróbio; Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável.

Tabela III.11. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Aeromonas spp.*, *Pasteurella spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Bordetella spp.* e *Alcaligenes spp.* (Quinn et al., 2005).

Teste	<i>A. spp.</i>	<i>P. spp.</i>	<i>P. spp.</i>	<i>A. spp.</i>	<i>B. spp.</i>	<i>A. spp.</i>
Motilidade	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos. Neg. ( <i>B. parapert.</i> )	Pos.
Nitrato	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg. Pos. ( <i>B. bronchi.</i> )	Pos. Neg. ( <i>A. fecalis</i> )
Glicose	Pos.	Pos. Neg. ( <i>P. anatip.</i> )	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
Lisina	Pos.	Neg.	Pos.			
Ornitina	Neg.		Pos.			
Indol	Pos.	Neg. Pos. ( <i>P. mult./pneu.</i> )	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
Urea	Pos.	Neg. Pos. ( <i>P. pneu./aero./urea.</i> )	Neg.	Pos.	Pos. Neg. ( <i>B. avium</i> )	Neg.
Gelatina	Pos.	Neg.	Neg.			Neg.
H <sub>2</sub> S		Neg.		Pos. Neg.	Neg.	
Arabinose	Pos.		Neg.	Pos. ( <i>A. suis</i> )		
Sacarose	Pos.	Pos. Neg. ( <i>P. anatip.</i> )	Neg.	Pos.		
Esculina	Pos.		Neg.			

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

**v. Tabelas de testes bioquímicos utilizados na diferenciação entre as espécies pertencentes ao grupo *Enterobacteriaceae* (IMViC - Indol, vM, Vp e Citrato).**

Tabela III.12. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Edwardsiella spp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Shigella spp.* e *Yersinia enterocolitica* - IMViC (++--); (Quinn et al., 2005).

IMViC (++--)	H <sub>2</sub> S (TSI)	Ureia	Fenilalanina	Sacarose	Lisina
<i>E. spp.</i>	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.
<i>E. coli</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.
<i>M. morganii</i>	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>P. vulgaris</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
<i>S. spp.</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Y. enterocolitica</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.13. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* e *Serratia rubidaea* - IMViC (--++); (Quinn et al., 2005).

<b>IMViC (--++)</b>	<b>Lisina</b>	<b>Arginina</b>	<b>Ornitina</b>	<b>Lactose</b>	<b>Pigmento</b>
<i>E. aerogenes</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>E. cloacae</i>	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Ausente
<i>K. pneumoniae</i>	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>S. liquefaciens</i>	Var.	Neg.	Pos.	Var.	Vermelho
<i>S. marcescens</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Vermelho
<i>S. rubidaea</i>	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Vermelho

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável.

Tabela III.14. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* e *Serratia liquefaciens* - IMViC (--++); (Quinn et al., 2005).

<b>IMViC (--++)</b>	<b>H<sub>2</sub>S (TSI)</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Ornitina</b>	<b>Salicina</b>	<b>Pigmento</b>
<i>C. freundii</i>	Var.	Neg.	Var.	Var.	Ausente
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Var.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Var.	Ausente
<i>P. mirabilis</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>S. spp.</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Ausente
<i>S. liquefaciens</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Vermelho

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.15. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Shigella sonnei*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis* - IMViC (--++); (Quinn et. al, 2005).

<b>IMViC (--++)</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Lisina</b>	<b>Ornitina</b>	<b>Salicina</b>	<b>Rhamnose</b>
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Var.	Pos.
<i>H. alvei</i>	Neg.	Pos.	Pos.	Var.	Pos.
<i>P. mirabilis</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
<i>S. spp.</i>	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.
<i>S. sonnei</i>	Neg.	Neg.	Var.	Neg.	Var.
<i>S. spp.</i>	Neg.	Neg.	Var.	Neg.	Var.
<i>Y. enterocolitica</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Var.	Neg.
<i>Y. pestis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Var.	Neg.
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Var.	Pos.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável.

Tabela III.16. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* e *Serratia rubidaea* - IMViC (----); (Quinn et al., 2005).

<b>IMViC (----)</b>	<b>H<sub>2</sub>S (TSI)</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fenilalanina</b>	<b>Lisina</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Pigmento</b>
---------------------	-----------------------------	--------------	---------------------	---------------	------------------	-----------------

<i>E. aerogenes</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>K. pneumoniae</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>P. mirabilis</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Ausente
<i>S. liquefaciens</i>	Neg.	Var.	Neg.	Var.	Pos.	Vermelho
<i>S. marcescens</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Vermelho
<i>S. rubidaea</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Vermelho

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.17. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Serratia rubidaea* e *Yersinia enterocolitica* - IMViC (-+++); (Quinn et al., 2005).

IMViC (-+++)	H <sub>2</sub> S (TSI)	Ornitina	Gelatina	Manitol	Pigmento
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>P. mirabilis</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Ausente
<i>S. rubidaea</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Vermelho
<i>Y. enterocolitica</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Ausente

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.18. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Citrobacter spp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus vulgaris* e *Providencia spp.* - IMViC (+++); (Quinn et al., 2005).

IMViC (+++)	H <sub>2</sub> S (TSI)	Fenilalanina	Ornitina	Manitol
<i>C. spp.</i>	Neg.	Neg.	Var.	Pos.
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.
<i>P. vulgaris</i>	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>P. spp.</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Var.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo; Var.-Variável; H<sub>2</sub>S-Ácido Sulfídrico.

Tabela III.19. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei* e *Yersinia pestis* - IMViC (----); (Quinn et al., 2005).

IMViC (----)	Maltose	Rhamnose	Lisina	Sacarose
<i>E. agglomerans</i>	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.
<i>H. alvei</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
<i>Y. pestis</i>	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo.

Tabela III.20. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens* - IMViC (---+); (Quinn et al., 2005).

IMViC (---+)	Ornitina	Gelatina	Sacarose	Pigmento
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Pos.	Neg.	Neg.	Ausente

<i>S. liquefaciens</i>	Pos.	Pos.	Pos.	Vermelho
------------------------	------	------	------	----------

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo.

Tabela III.21. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei* e *Serratia rubidaea* - IMViC (---); (Quinn et al., 2005).

IMViC (---)	Ornitina	Gelatina	Rhamnose	Sacarose	Pigmento
<i>E. agglomerans</i>	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Ausente
<i>H. alvei</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Ausente
<i>S. rubidaea</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Vermelho

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo.

Tabela III.22. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans* e *Klebsiella oxytoca* - IMViC (++++ ou +---); (Quinn et al., 2005).

IMViC (++++ ou +---)	Lisina
<i>E. agglomerans</i>	Neg.
<i>K. oxytoca</i>	Pos.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo.

Tabela III.23. Testes bioquímicos para diferenciação entre *Enterobacter agglomerans* e *Yersinia enterocolitica* - IMViC (+++); (Quinn et al., 2005).

IMViC (+++)	Ornitina
<i>E. agglomerans</i>	Neg.
<i>Y. enterocolitica</i>	Pos.

Legendas: Pos.-Positivo; Neg.-Negativo.