

Francisco Carlos Ferreira Junior

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE TUCANOS E ARAÇARIS
(AVES: PICIFORMES) EM CATIVEIRO
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012**

F383a Ferreira Júnior, Francisco Carlos, 1986-
Avaliação sanitária de tucanos e araçarís (Aves: Piciformes) em cativeiro no estado de Minas Gerais / Francisco Carlos Ferreira Júnior. – 2012.
80 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Tucano – Teses. 2. Ave – Doenças – Teses. 3. Clostridium perfringens – Teses.
4. Malária aviária – Teses. 5. Parasito – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.686 089 6

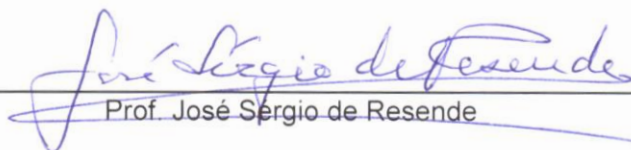
Dissertação defendida e aprovada em 22 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente



Profª. Tânia de Freitas Raso



Prof. José Sérgio de Resende



Profª. Érika Martins Braga

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus amados pais, pela educação e valores a mim transmitidos;

Aos meus irmãos, Memê, Lucas e Maria, pela doce presença em minha vida;

Ao meu amado padrasto, pela dedicação e carinho à nossa família.

Tive a felicidade de trabalhar com quatro grandes professores, por isso, gostaria de demonstrar minha gratidão...

Ao Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins, cujo papel de orientador foi irretocável, mantendo uma relação cordial e próxima, sempre disposto a ouvir novas idéias e questionamentos. Conviver com um pesquisador, educador e humanista como o Prof. Nelson é um privilégio gratificante.

À Prof. Érika Martins Braga, que muito bem me acolheu no Laboratório de Malária e desde então tem contribuído com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. José Sérgio de Resende, pois seus conselhos, questionamentos e auxílio foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Maurício, pelo exemplo de dedicação e doação à ciência e pelas discussões produtivas, sempre regadas a bons cafés e chocolates.

Meus agradecimentos,

Aos amigos do Laboratório de Doenças das Aves. Ao Marcus, pela confiança e parceria desde a IC até os dias de hoje. À Sandra, pelo grande auxílio, companheirismo e dedicação ao laboratório. Ao Daniel, pelo auxílio em várias partes deste estudo e por disponibilizar os animais do CETAS. Ao André Fernandes, pelas fotografias, conversas produtivas, e por me transmitir um pouco de sua empolgação com a pesquisa. Ao Rogério pela ajuda no laboratório e em coletas. À Danielle e à Alessandra, pela ajuda no primeiro ano do mestrado. Ao Aléxis pelo auxílio. À Marcela pela convivência e ao Rodrigo Horta, pelo trabalho com os tucanos na nossa época de IC.

Ao Cláudio Públio, pela manutenção do laboratório em condições para realizar este trabalho, pela companhia divertida e pela música clássica depois do almoço.

Aos amigos do Laboratório de Malária. Em especial ao Gustavo e ao Gabriel, cuja ajuda foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho. À Paty e à Nayara, pelo conhecimento compartilhado e pela colaboração. Ao Gilberto e ao núcleo de Malária Humana, Ana Luiza, Ingrid, Luíza, Trycia, e Zélia e Thiago, pela companhia e ajuda.

Ao amigo e grande pesquisador, Rodrigo Otávio Silva, pela parceria no trabalho com clostrídeos e ao Prof. Francisco Lobato, por disponibilizar o Laboratório de Anaerobioses para a execução desta parte do estudo.

Ao grande número de pessoas que disponibilizaram os animais para este estudo. Aos Médicos Veterinários Marcos Mourão Motta, Leonardo Maciel, e Rafael Rezende; Wandir Resende; Mozart; Felipe Coutinho; à Ângela Fagioli e à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte; ao Daniel Dias do CETAS e à Ana Paulina do zoológico, ambos de Montes Claros; ao senhor Moacir e toda a equipe do Criadouro de Poços de Caldas.

Aos estagiários do CETAS/BH, Gustavo, Érika, Ellen, Jaqueline, Wander, Fabiana e Nathália que me avisavam sobre a chegada de animais e por me ajudarem nas coletas.

Ao Antônio Messias Costa, grande amigo, mentor e exemplo de Médico Veterinário que trabalha em prol da fauna brasileira. Se me enveredei por esta parte da profissão, o estágio no Museu Paraense Emílio Goeldi é o principal responsável.

À minha gigantesca e amada família, fonte inesgotável de carinho, amor e apoio e aos meus amigos do Colégio Tiradentes, do bairro e da graduação, pela companhia em grandes momentos e por tornar o período do mestrado mais leve e prazeroso.

Ao contribuinte brasileiro, que, às vezes sem saber, fomenta as universidades públicas e a pesquisa brasileira.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	8
ANEXO.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Ranfastídeos brasileiros	15
2.2.3. Malária aviária	18
2.2.4. Clostridiose.....	20
2.2.5. Endoparasitos.....	22
2.2.6. Ectoparasitos	23
2.2.7. Clamidiose aviária	23
2.2.8. Doenças previstas no programa nacional de sanidade avícola.....	24
2.2.8.1. Salmoneloses	25
2.2.8.2. Micoplasmoses	26
2.2.8.3. Doença de Newcastle	27
OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral.....	29
MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Locais e período de execução do projeto	29
4.2. Contenção, avaliação das aves e coleta de ectoparasitos.....	29
4.3. Coletas de sangue e <i>swabs</i> cloacais.....	31
4.4. Exames coproparasitológicos.....	31
4.5. Necropsia dos animais	31
4.6. Extração e quantificação do DNA de <i>swabs</i> e tecidos.....	31
4.7. Pesquisa de hemoparasitos	32
4.7.1. Extração de DNA de sangue.....	32
4.7.2. PCR de diagnóstico e confirmação em esfregaço sanguíneo	32
4.7.3. PCR para sequenciamento	33
4.7.4. Purificação dos produtos da PCR com polietileno glicol (PEG).....	34

4.7.5. Reação de sequenciamento e análise filogenética	34
4.8. <i>Clostridium perfringens</i>	35
4.8.1. Isolamento e genotipagem	35
4.8.2. Susceptibilidade antimicrobiana.....	36
4.9. PCR para <i>Chlamydomphila psittaci</i>	36
4.10. Soroaglutinação rápida em placa (SAR) para <i>Salmonella Pullorum</i> e <i>M. gallisepticum</i>	37
4.11. Teste de inibição da hemaglutinação (IH) para o vírus da doença de Newcastle	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Malária aviária	38
5.2. Clostridioses	46
5.3. Endoparasitos.....	49
5.4. Ectoparasitos.....	52
5.5. Clamidiose aviária	55
5.6. Sorologia para <i>Salmonella Pullorum</i> , <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e vírus da doença de Newcastle	55
5.6.1. Salmonelose.....	56
5.6.2. Micoplasmose.....	56
5.6.3. Doença de Newcastle	57
5.7. Considerações finais	58
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos indivíduos amostrados de acordo com a instituição mantenedoura.....	30
Tabela 2	Distribuição numérica das espécies estudadas segundo cada teste realizado.....	30
Tabela 3	Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para tipificação de <i>Clostridium perfringens</i>	36
Tabela 4	Distância genética entre linhagens e morfoespécies de <i>Plasmodium</i> spp.....	45
Tabela 5	Concentração Inibitória Mínima (CIM = mg/L) de <i>Clostridium perfringens</i> isolados de ranfastídeos de cativeiro em Minas Gerais.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da região do gene mitocondrial <i>cyt-b</i> de <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> amplificada na Nested-PCR do presente estudo.....	34
Figura 2	Gel de Poliacrilamida 6% evidenciando a amplificação de 198 pb do gene SSU de hemosporídeos pela técnica de PCR.....	38
Figura 3	Distribuição percentual das aves positivas à PCR para <i>Plasmodium/Haemoproteus</i>	39
Figura 4	Microfilárias evidenciadas em esfregaços sanguíneos de <i>R. toco</i> (A) e de <i>R. vitellinus</i> (B) (1000X).....	40
Figura 5	Meronte de <i>Plasmodium</i> sp., contendo quatro merozoítos, encontrado em eritrócito de <i>Ramphastos toco</i> (1000X).....	40
Figura 6	Gel de Poliacrilamida 6% evidenciando a amplificação de 515 pb do gene mitocondrial <i>cyt-b</i> de <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> pela técnica de PCR.....	41
Figura 7	Árvore filogenética de <i>Plasmodium</i> spp. isolados de ranfastídeos em cativeiro no estado de Minas Gerais.....	42
Figura 8	Distribuição percentual do endoparasitismo nas aves do presente estudo, de acordo com a forma do parasito encontrado nas fezes (Ovos de tricurídeos ou oocistos de coccídeos).....	50
Figura 9	Ovos de helmintos da família Trichuridae, encontrados em fezes de <i>Ramphastos tucanus</i> (400X).....	51
Figura 10	Oocisto de <i>Eimeria</i> sp. encontrado em fezes de <i>Ramphastos toco</i> , esporulado em dicromato de potássio (400X).....	51
Figura 11	Distribuição percentual do ectoparasitismo nas aves avaliadas no presente estudo.....	52
Figura 12	Parasitismo por piolhos em <i>R. dicolorus</i>	54
Figura 13	Parasitismo por ácaros plumícolas em <i>R. tucanus</i>	54

Figura 14	Lesões nas articulações tíbiotarso-metatarso em <i>R. dicolorus</i>	54
-----------	---	----

APÊNDICE

Apêndice 1	Animais pesquisados no presente estudo, demonstrando a detecção ou não dos quatro grupos de agentes etiológicos encontrados (<i>Plasmodium</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , endoparasitos e ectoparasitos).....	74
------------	--	----

ANEXO

Anexo 1	Certificado de aprovação do protocolo 14/2010 pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA/UFMG)	78
Anexo 2	Autorização para atividades com finalidade científica pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, protocolo 24619-1.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ALT	Aglutinação lenta em tubos
APMV-1	Paramyxovirus aviário tipo 1
CE	Corpúsculo elementar
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CETAS/BH	Centro de Triagem de Animais Silvestres do Ibama de Belo Horizonte
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>cpa</i>	Gene codificante da toxina alfa
<i>cpb</i>	Gene codificante da toxina beta
<i>cpb-2</i>	Gene codificante da toxina beta-2
<i>cpe</i>	Gene codificante da toxina da enterotoxina
CR	Corpúsculo reticulado
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
<i>cyt-b</i>	Citocromo oxidase subunidade c
DN	Doença de Newcastle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático

EN	Enterite necrótica
<i>etx</i>	Gene codificante da toxina épsilon
EV/UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
FVV	Vale Verde Alambique e Parque Ecológico
<i>ia</i>	Gene codificante da toxina iota
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IH	Inibição da Hemaglutinação
MAARA	Ministério de Estado da Agricultura, Abastecimento e da Reforma Agrária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NetB	<i>Necrotic enteritis toxin B-like toxin</i>
OIE	Organização Internacional de Epizootias
P.A.	Puro para análise
PA	<i>Pteroglossus aracari</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno glicol
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
qsp	Quantidade suficiente para
RD	<i>Ramphastos dicolorus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	<i>Ramphastos toco</i>
RT-PCR	Transcriptase reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
Rtuc	<i>Ramphastos tucanus</i>
RV	<i>Ramphastos vitellinus</i>
SAR	Soroaglutinação Rápida em Placa
SM	<i>Selenidera maculirostris</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (Livre de patógenos específicos)

SPS	Sulfito Polimixina Sulfadiazina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TGI	Trato gastrointestinal
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHA	Unidades hemaglutinantes
UV	Ultravioleta
VDN	Vírus da Doença de Newcastle

RESUMO

Tucanos e araçarís são aves da família Ramphastidae, ordem dos Piciformes. Essas aves são de grande importância ecológica, devido ao seu papel na dispersão de sementes, favorecendo a recuperação de florestas. A manutenção e reprodução de ranfastídeos em cativeiro são dificultadas por diversos fatores, incluindo erros no manejo sanitário. O presente estudo avaliou 144 ranfastídeos, sendo 129 animais do gênero *Ramphastos*, 11 *Pteroglossus* e quatro *Selenidera*, mantidos em 13 instituições no estado de Minas Gerais. Testes foram realizados para *Plasmodium/Haemoproteus* (esfregaços sanguíneos e PCR de sangue e baço), *Clostridium perfringens* (isolamento de swab cloacal), *Chlamydophila psittaci* (PCR de swab cloacal) e para a presença de endo e ectoparasitos. A presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Salmonella Pullorum* (SP) foi avaliada por soroaglutinação rápida (SAR) e contra o Paramyxovírus aviário tipo 1 (APMV-1) através da inibição da hemaglutinação (IH). De 143 aves testadas quanto a presença de hemosporídeos, 58 foram positivas na PCR (40,5%) e apenas trofozoítos e merontes de *Plasmodium* spp. foram encontrados em esfregaços sanguíneos. O sequenciamento de 20 amostras revelou cinco linhagens diferentes de *Plasmodium* spp. que poderiam constituir quatro morfoespécies diferentes. Microfilárias foram encontradas em três de 58 tucanos avaliados (5,2%). *Clostridium perfringens* foi isolado de 11 aves (8,5%), sendo todos pertencentes ao tipo A e com o gene *cpb2* detectado em três isolados. Ao teste da concentração inibitória mínima, todos os isolados de *C. perfringens* foram sensíveis à penicilina, vancomicina e metronidazol e 81 e 36% dos isolados foram sensíveis à eritromicina e oxitetraciclina, respectivamente. Todas as amostras foram resistentes à lincomicina. Endoparasitos foram encontrados em 38 (31%) aves, de 123 avaliadas, sendo que 24 (19,5%) estavam parasitadas por coccídeos e 12 (9,5%) por capilarídeos. Larvas de nematódeos foram detectadas em amostras de fezes de dois animais (1,6%). Dezesesseis aves estavam parasitadas por piolhos (Phthiraptera) (11,1%) e treze por ácaros plumícolas (Astigmata) (9%), totalizando ectoparasitismo em 20,1% dos animais. As aves não apresentaram títulos detectáveis de anticorpos para MG, SP e APMV-1. Todas as aves foram negativas para *C. psittaci*. No total, 66,6% das aves foram positivas para pelo menos um agente etiológico, sendo que 65 (45,1%), 21 (14,6%) e 10 (7,0%) aves foram detectadas com uma, duas e três etiologias, respectivamente. Ranfastídeos, ao serem deslocados de uma instituição para outra e os candidatos à reintrodução na natureza, devem ser avaliados, para evitar a introdução de patógenos e parasitos em locais

previamente isentos. Adicionalmente, aves permanentes em cativeiro possuem o risco de adquirir e transmitir patógenos de animais de vida livre, que frequentam essas instituições.

Palavras-chave: Ramphastidae, doenças, malária aviária, *Clostridium perfringens*, *Chlamydophila psittaci*, parasitos.

ABSTRACT

Toucans and aracarís are birds of family Ramphastidae order Piciformes. Such birds are of great ecological importance for their role in seed dispersion favoring forest recomposition. Maintenance and reproduction of these birds in captivity is impaired for several reasons including improper sanitary management. The present study evaluated 144 ramphastids, being 129 from genus *Ramphastos* (*R. toco*, *R. dicolorus*, *R. tucanus* e *R. vitellinus*), 11 *Pteroglossus* (*P. aracari*, *P. inscriptus*, *P. bitorquatus*, *P. castanoti*, *P. bailloni*) and four *Selenidera* (*S. maculirostris*), kept in 13 different locations in Minas Gerais state. Tests were conducted for *Plasmodium/Haemoproteus* (microscopy of stained blood smear and PCR of blood and spleen), *Clostridium perfringens* (isolation from cloacal swabs), *Chlamydophila psittaci* (PCR of cloacal swabs) and endoparasites and ectoparasites. Antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Salmonella Pullorum* (SP) were evaluated by rapid plate agglutination test (RPA) and against avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) by hemagglutination inhibition (IH). From 143 birds assessed for hemosporidians, 58 were positive (40,5%) and only trophozoites and meronts of *Plasmodium* spp. were visualized in blood smears. Sequencing from 20 samples yielded five different lineages of *Plasmodium* spp. that could constitute four different morphospecies. Microfilariae were found in three out of 58 birds evaluated. *Clostridium perfringens* were isolated from 11 birds (8,5%), being all type A strains, with gene *cpb2* detected in three samples. In the minimum inhibitory concentration (MIC) test, all *C. perfringens* isolated were sensitive for penicillin, vancomycin and metronidazole, 81 and 36% of the isolates were sensitive for erythromycin and oxytetracyclin, respectively and all isolates were resistant to lincomycin. Endoparasites were found in 38 (31%) birds, with 24 parasitized by coccidians (19,5%) and 12 (9,5%) by capillarids. Sixteen birds were parasitized by lice (Phthiraptera) (11,1%) and 13 by feather mites (Astigmata) (9%). Birds did not show antibodies titres for MG, SP and APMV-1 and were negative for *C. psittaci*. In this study, 66,6% of the birds were shown with at least one etiology assessed, being 66 (45,1%), 21 (14,6%) and 10 (7,0%), with one, two and three etiological agents, respectively. Preventive veterinary medicine against infectious and

parasitic diseases of raphastids should involve testing and quarantine of birds to be transported to another holding or released into the wild. Raphastids should be assessed for parasitic and infectious diseases prior to being transferred between captive facilities and before reintroductions in nature, in order to prevent the introduction of pathogens and parasites in places previously absent.

Keywords: Raphastidae, diseases, avian malaria, *Clostridium perfringens*, *Chlamydophila psittaci*, parasites.

INTRODUÇÃO

Os Tucanos e Araçarís são aves da família Ramphastidae, que, por sua vez, é integrante da ordem Piciformes. São restritas à região neotropical e se caracterizam pelo bico de grandes proporções em relação ao corpo, que associado às cores vibrantes e variadas de suas penas, denotam nestas aves beleza singular. Possuem importância ecológica devido ao grande potencial de dispersão de sementes e desempenham papel fundamental na regeneração de florestas.

Apesar de a família Ramphastidae não possuir nenhuma espécie ameaçada de extinção, suas populações sofrem grande pressão antrópica, pelas alterações provocadas no meio ambiente e pelo comércio ilegal. Essas aves possuem baixo sucesso reprodutivo em cativeiro, assim, praticamente todos os indivíduos presentes em exibição ou sob posse no Brasil são oriundos de vida livre. O centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, recebeu, entre os anos de 2009 e 2011, um total de 125 tucanos, oriundos de apreensões de traficantes e de mantenedores ilegais. Uma vez que grande parte dos animais traficados não é localizada por órgãos fiscalizadores e que pequena parcela de indivíduos retirados da vida livre chegam ao destino, o impacto do tráfico na família Ramphastidae é considerável.

O Brasil possui uma grande diversidade de avifauna, no entanto, pouco se sabe sobre doenças que acometem esses animais em vida livre e em cativeiro. Menos ainda é conhecido sobre afecções de ranfastídeos. Os poucos trabalhos existentes se limitam a relatos de casos esporádicos e o único estudo profundo abordou uma doença metabólica muito comum nesse grupo de aves, a hemocromatose. O baixo sucesso reprodutivo desses animais em cativeiro se deve a vários fatores, dentre eles, erros no manejo sanitário, levando à morbidade e

mortalidade de adultos e filhotes. Com isso, avaliação sanitária de populações cativas é importante por apontar erros no manejo e eventualmente propor soluções para questões levantadas.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ranfastídeos brasileiros

Os ranfastídeos pertencem à ordem dos Piciformes, cujos membros da fauna brasileira são divididos em três famílias: Capitonidae, Picidae e Ramphastidae. Esta última integra quatro gêneros: *Ramphastos* (tucanos), *Aulacorhynchus* (tucaninhos), *Selenidera* e *Pteroglossus* (araçarís e saripocas), segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2011). A família é exclusiva da região neotropical, distribuindo-se do sul do México até o norte da Argentina, com representantes em todos os biomas brasileiros, sendo sua maior diversidade na região Amazônica (Cubas, 2006). Os ranfastídeos provavelmente divergiram da família Picidae entre 30 e 50 milhões de anos atrás e os animais do gênero *Ramphastos* se separaram dos Araçarís há cerca de 12,2 - 25 milhões de anos (Patané, 2007).

São aves de hábitos diurnos, que se reúnem ao fim do dia para dormirem em bandos e passam a noite em galhos de árvores ou no interior de cavidades. Dormem com a cauda elevada e a cabeça voltada posteriormente, coberta pelas asas (Sick, 1997). Nidificam em buracos ou fendas existentes em árvores, assim como em barrancos e cupinzeiros. O número de ovos é de dois a quatro por postura, sendo o período de incubação de cerca de 18 dias em cativeiro para quase todas as espécies. Os filhotes nascem sem penas e com os olhos fechados e possuem calos tarso-metatarsianos característicos e o cuidado parental é realizado pelo macho e pela fêmea (Sick, 1997; Jennings, 2008).

São onívoros, sendo que a maior parte da dieta é constituída por frutos, havendo correlação positiva na taxa de ingestão destes com os teores de lipídeos. Alimentam-se também de artrópodes e atacam ninhos de aves menores, principalmente passeriformes, predando ovos e filhotes. Ranfastídeos recém saídos do ninho tem maior avidez por este tipo de alimento (Sick, 1997). Em cativeiro, a dieta deve ser constituída por frutos, verduras e rações, sendo que estas devem conter baixas concentrações de ferro (50-80ppm)(Cubas, 2006).

Os tucanos medem de 46 a 66cm e os araçarís de 33 a 43cm, com peso variando entre 600 e 125g (Galetti *et al.*, 2000; Sick, 1997). O bico colorido e longo, que pode ter de 5 a 23 cm, é a principal característica desse grupo de aves. É robusto, mas é leve, por ser composto de trabéculas ósseas de aspecto esponjoso. Compreende 1/3 do tamanho do *Ramphastos toco*, mas é responsável por apenas 1/20 do peso do animal (Seki *et al.*, 2005). Ranfastídeos não possuem ingluvío e nem ceco, e por terem o trato gastrointestinal relativamente curto, o trânsito do alimento é rápido, gerando excrementos volumosos e úmidos. A vesícula biliar é alongada e o baço é arredondado (Cubas, 2006).

São caçados pelo homem para alimentação e por, tradicionalmente, serem exibidos como troféus, assim como pelo fato dos bicos apresentarem participação na medicina popular. Além disso, são retirados da natureza para a comercialização ilegal (Sick, 1997; Alves, 2009). A pressão de caça e a fragmentação de hábitat, apontadas como as principais causas de perda de biodiversidade, tem provocado a diminuição de populações da avifauna brasileira, incluindo de tucano toco (*Ramphastos toco*) (Chiarello, 2000; Thiollay, 2005). Mikich (2001) monitorou tucanos, pica paus e outras aves frugívoras no Sudeste brasileiro e também observou

declínio nessas populações em áreas fragmentadas.

Animais do gênero *Ramphastos* são os principais dispersores de sementes na América Central e, provavelmente, o são na Mata Atlântica (Galetti *et al.*, 2000). Outro estudo apontou que, devido à grande área abrangida em vôo pelos ranfastídeos e à grande diversidade de espécies vegetais utilizadas como alimento por estes, tucanos e araçarís têm papel fundamental na regeneração de florestas (Holbrook, 2011).

Apesar de não serem ameaçadas de extinção, projetos de conservação devem considerar estas espécies por sua interação com a recuperação florestal e com outras espécies de aves. O tucano toco (*Ramphastos toco*), por exemplo, é essencial para o sucesso reprodutivo da arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), uma das aves mais ameaçadas da América Latina (Pizo *et al.*, 2008).

2.2. Aves silvestres de cativeiro e em triagem

Com a diminuição dos ambientes naturais e o aumento do número de espécies ameaçadas, a criação em cativeiro tem se tornado um importante componente para a conservação da vida silvestre, através de pesquisas em áreas como biologia animal e medicina veterinária (Munson e t al., 1993; Allgayer e Cziulik, 2007).

Apesar da grande biodiversidade brasileira, pouco se sabe sobre os potenciais patógenos e seus impactos, tanto da fauna de vida livre quanto da cativa. Estudos científicos, como a determinação da incidência e da distribuição de agentes etiológicos nessas populações, são tarefas urgentes e prioritárias (Catão-Dias, 2008). As causas de perda de biodiversidade são variadas e complexas, sendo a transformação do hábitat a principal delas. No entanto, o tráfico e a caça de animais

silvestres, a introdução de espécies exóticas e a ocorrência de epizootias, das quais patógenos adaptados aos animais domésticos ultrapassam essa barreira e resultam em doença à fauna selvagem, também são importantes (Catão-Dias, 2003). Sem o conhecimento sobre agentes etiológicos circulantes entre animais silvestres cativos ou de vida livre, programas conservacionistas podem fracassar devido à perda dos animais introduzidos ou translocados, ou pela possibilidade da introdução de doenças em ambientes previamente isentos (Catão-Dias, 2008). Além disso, é provável que o papel das doenças nos processos de extinção de espécies seja subestimado, devido ao pouco conhecimento sobre agentes etiológicos em animais ameaçados (Smith *et al.*, 2008). Em um programa de criação e soltura de uma espécie de ave da Nova Zelândia extremamente ameaçada (*Himantopus novaezelandiae*), doenças infecciosas contaram como a primeira causa de mortalidade em filhotes e a segunda entre as demais faixas etárias (Heezik *et al.*, 2005).

Doenças de animais cativos e de vida livre são comparáveis entre si, fazendo com que práticas de conservação *in situ* se beneficiem de pesquisas biomédicas em animais de cativeiro (Munson e Cook, 1993). Como as áreas naturais podem estar reduzidas ou fragmentadas, a pressão sobre animais de vida livre se aproxima à sofrida pelos indivíduos cativos. Assim, animais mantidos *ex situ* podem servir como modelo para estudar as respostas *in situ* aos diversos desafios nos ambientes naturais (Munson *et al.*, 1993). Grande parte das doenças infecciosas são subclínicas, com isso, a vigilância em populações cativas e de vida livre se torna uma importante ferramenta para a avaliação do manejo e do ambiente onde esses animais estão inseridos (Murphy *et al.*, 1993), sendo que coletas sistemáticas de dados são essenciais para o estabelecimento estatístico da

importância de certas doenças para elaboração de estratégias conservacionistas.

O crescimento das populações de tucanos em cativeiro é prejudicado devido a doenças e ao baixo número de nascimento de filhotes. Para o sucesso reprodutivo dessas espécies, fatores como a formação de casais compatíveis, instalações e dietas adequadas e bons programas de sanidade animal são essenciais (Jennings, 2001).

Grande parte dos ranfastídeos em cativeiro no Brasil é proveniente do comércio ilegal. Com o interesse de manutenção desses animais, a falta de fiscalização e com os baixos índices reprodutivos, a pressão sobre populações naturais tende a aumentar (Cziulik, 2010). Considerável número de ranfastídeos, principalmente tucanos toco, são recebidos por centros de triagem de animais silvestres (CETAS). No CETAS de Belo Horizonte, em um período de três anos, 125 tucanos foram recebidos (Vilela, 2012). Estes animais são triados e posteriormente destinados a mantenedouros de fauna, criatórios científicos ou encaminhados para programas de reintrodução na natureza. Devido ao trânsito dessas aves, pesquisas por etiologias, como protocoladas por Woodford (2000), são essenciais para evitar a introdução de patógenos em coleções animais ou em meios silvestres previamente isentos. Dentre as medidas consideradas importantes pelo autor supracitado estão: quarentena mínima de 30 dias, avaliações periódicas para a presença de endo e ectoparasitos, testes sorológicos para o vírus da doença de Newcastle, micoplasmoses e salmoneloses e pesquisa para a detecção de *C. psittaci*.

Programas de conservação e recuperação da fauna silvestre devem contemplar o manejo de enfermidades, gerando informações acerca da interação entre agente etiológico e o hospedeiro e dos fatores ambientais que

interferem nessa relação. Para isso é necessária a atuação integrada do médico veterinário (Azpiri *et al.*, 2000).

Trabalhos sobre avaliação sanitária de aves foram previamente publicados envolvendo petréis gigantes (Uhart *et al.*, 2003), albatrozes (Padilha *et al.*, 2003), comorões de Galápagos (Travis *et al.*, 2006), pinguins de galápagos (Travis *et al.*, 2006) e de Humboldt (Smith *et al.*, 2008) e pássaros de vida livre (Newman *et al.*, 2007). Os estados sanitários de papagaios comuns de vida livre e de cativeiro (Deem *et al.*, 2005), de papagaios de São Vicente (Deem *et al.*, 2008) e de aves de rapina de cativeiro (Santos, 2011) também foram abordados. Avaliações sanitárias de araras azuis no Pantanal (Allgayer *et al.*, 2009), de cracídeos e tinamídeos em cativeiro (Marques, 2010) e de aves de rapina de recolhimento (Andery, 2011) foram realizadas no Brasil. No entanto, nenhum dentre todos esses trabalhos abordou aves da ordem dos Piciformes, tampouco ranfastídeos. Sousa (2007) pesquisou diversas espécies capturadas no entorno de uma granja avícola quanto ao contato com agentes etiológicos comuns na avicultura. Do total de 83 aves, apenas um ranfastídeo (*R. toco*) foi pesquisado sorologicamente para *Salmonella Pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*, vírus da doença de Newcastle e para o vírus da bronquite infecciosa.

Doenças infecciosas emergentes tem sido comumente citadas como ameaça à vida silvestre, animais de produção e ao homem (Daszak *et al.*, 2000), sendo que as aves exercem importante papel no ciclo epidemiológico de doenças zoonóticas (Chomel *et al.*, 2007). Como exemplo, há relato de um surto de doença parasitária (tricomoníase) na Grã-Bretanha, que foi responsável pelo declínio populacional de Passeriformes de vida livre (Robinson *et al.*, 2010). Coleções que reúnem aves infectadas e não infectadas originadas de

diferentes regiões são de grande preocupação quanto à emergência de doenças (Schrenzel *et al.*, 2003). Por estes motivos, a avaliação do estado de saúde e o levantamento de agentes etiológicos que acometem animais de cativeiro são de grande relevância.

2.2.3. Malária aviária

As aves são acometidas por, principalmente, três gêneros de hemosporídeos: *Plasmodium*, o agente etiológico da malária aviária; *Haemoproteus*, que pode causar doença semelhante à malária; e o *Leucocytozoon*, que possui grande impacto na criação de gansos, patos e galinhas. (Valkiunas, 2005). O gênero *Plasmodium* é dividido em cinco subgêneros, baseado nas características morfológicas e biológicas dos ciclos eritrocitários e exoeritrocitários, sendo eles: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella* e *Huffia* (Garnham, 1966) e *Bennettinia* (Valkiunas, 2005). A caracterização de haplótipos, através de sequenciamento genético do parasito, tem demonstrado que o número de espécies de hemosporídeos pode ser tão grande quanto o número de espécies de aves (Bensch *et al.*, 2004).

Os hemosporídeos são heteroxenos que realizam a fase sexuada em dípteros hematófagos (Insecta: Diptera) e se desenvolvem assexuadamente nas aves. As formas visíveis nos esfregaços sanguíneos são as eritrocíticas (trofozoítos, merontes e gametócitos), que surgem após replicações assexuadas (merogonia ou esquizogonia) das formas exoeritrocíticas do parasito nos órgãos do vertebrado. No entanto, formas exoeritrocíticas de algumas espécies de *Plasmodium* podem ser visualizadas em células brancas em esfregaços sanguíneos (Valkiunas, 2005).

Sinais clínicos em galinhas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* e *P. juxtannucleare* incluem letargia, cristas

hipocoradas, fezes esverdeadas e diarreicas e paralisia parcial ou total dos membros inferiores (Garnham, 1966). No Brasil, pinguins infectados por *P. relictum* apresentavam dispnéia, apatia, congestão ocular bilateral e protrusão da terceira pálpebra (Bueno *et al.*, 2010). Alterações relatadas em pássaros incluem diminuição da ingestão de alimentos, perda de peso (Atkinson *et al.*, 2000), diminuição do hematócrito e aumento de volume esplênico e hepático (Palinauskas *et al.*, 2008; 2009).

Algumas aves são conhecidas pela alta sensibilidade à malária. Pássaros da família Drepeniidae, endêmica do Havaí, sofreram grande impacto na diminuição do número de indivíduos e da área de ocorrência devido à introdução do *Plasmodium relictum* e de mosquitos do gênero *Culex* na região (Warner, 1968). Pinguins africanos de vida livre tiveram o óbito associado à infecção por *Plasmodium juxtannucleare*, que é uma espécie de vasta distribuição geográfica (Grim *et al.*, 2003). Em cativeiro, *P. relictum* levou pinguins de Magalhães a óbito, apesar de terem recebido tratamento antimalárico (Bueno *et al.*, 2010). Hemosporídeos oferecem custo para a migração (Waldenström *et al.*, 2002; Johannes *et al.*, 2009) e diminuem o sucesso reprodutivo de aves parasitadas (Ortego *et al.*, 2008; Knowles *et al.*, 2010). Além disso, o parasitismo por hemosporídeos pode tornar as aves susceptíveis a patógenos oportunistas, provocando doença clínica e mortalidade de animais cativos (Schrenzel *et al.*, 2003).

O diagnóstico da malária aviária é realizado pela visualização do parasito em esfregaço sanguíneo ou pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O primeiro é o método de diagnóstico considerado padrão ouro, sendo que pesquisas através de ambos os métodos tem validade científica (Garamszegi, 2010). A PCR é comumente citada como a técnica mais sensível (Waldenström *et al.*, 2004), no entanto, a

alta discrepância entre os resultados pode ser devido à avaliação de lâminas de esfregaço sanguíneo de baixa qualidade, devido ao pequeno número de eritrócitos avaliados ou por inexperiência do examinador (Valkiunas *et al.*, 2008).

No Brasil, a ocorrência de hemoparasitos foi estudada em animais de vida livre e em cativeiro. Woodworth-Lynas *et al.* (1989) avaliaram esfregaços sanguíneos de 15574 aves de vida livre do estado de São Paulo e encontraram a prevalência de 3,4% de infecções por *Haemoproteus* e 0,65% por *Plasmodium*. Passeriformes de vida livre em Minas Gerais foram amostrados e em 275 aves avaliadas, a prevalência foi de 16% à microscopia e 39,6% em PCR específica para *Plasmodium* sp. (Ribeiro *et al.*, 2005). Outro estudo abordou a avifauna de três habitats no estado do Tocantins (Cerrado intacto, Cerrado impactado e transição entre Cerrado e Floresta Amazônica), onde separadamente, a microscopia e PCR revelaram prevalências de 24,4 e 37,6%, respectivamente. Considerando as duas técnicas juntas, a prevalência foi de 49% (Belo *et al.*, 2011). Um dos poucos trabalhos realizados com aves de cativeiro levantou dados sobre *Plasmodium* sp. em Psitacídeos, avaliados pela combinação das técnicas de microscopia e PCR, sendo que, das 127 aves examinadas, 46 (36%) apresentavam-se parasitadas (Belo *et al.*, 2009).

Em *Ramphastos toco*, são descritas duas espécies de plasmódios: *P. huffi* do subgênero *Huffia* (Muniz *et al.*, 1951) e *P. pinottii* do subgênero *Giovannolaia* (Muniz e Soares, 1954). O primeiro, detectado em tucanos do zoológico do Distrito Federal, apresenta elevada especificidade e patogenicidade. O segundo, descrito em tucanos de vida livre, apresentou baixa especificidade, sendo patogênico para pombos e pintinhos experimentalmente inoculados. Manwell e Sessler (1971) descreveram o plasmódio *P. nucleophilum*

toucani em *Ramphastos swainsonii* e corroborou com as suspeitas de Garnham (1966) de que o trabalho de Muniz *et al.* (1951) envolveu coinfeção por *P. n. toucani* e *P. huffi*. No entanto o material do trabalho de 1951 foi perdido ao longo do tempo, e não está disponível para análise.

Um estudo realizado com 14 tucanos toco de um centro de triagem e de um criatório comercial em Minas Gerais apontou a ocorrência de *Plasmodium* sp. em esfregaço sanguíneo de oito animais (57,1%). Devido ao pequeno grupo amostral, não foi possível estabelecer a correlação entre parasitismo e o hematócrito das aves. Observou-se que as infecções eram crônicas, fato atribuído à baixa parasitemia e pela presença apenas de trofozoítos nos eritrócitos. No entanto, a frequência de parasitismo nos animais estudados poderia ter sido maior, uma vez que não foi realizada PCR para a detecção desse agente (Horta *et al.*, 2010).

A alta incidência da malária aviária e a sua importância clínica, além de viabilizar estudos epidemiológicos, justificam correções no manejo de aves em cativeiro visando o controle do vetor e do parasito. O monitoramento de aves cativas permanentes ou candidatas à reintrodução deve ser realizado, por este parasitismo constituir fator de risco de curto e longo prazo, evitando o contato de espécies nativas com o parasito, o que pode causar perdas significativas nas populações afetadas (Murata, 2002; Schrenzel *et al.*, 2003).

Não foram encontrados estudos sobre epidemiologia molecular e diversidade genética de hemoparasitos em aves da família Ramphastidae.

2.2.4. Clostridiose

Bactérias do gênero *Clostridium* são Gram-positivas, anaeróbias e que podem formar

esporos em condições adversas. *C. perfringens* pode ser comensal no trato intestinal de vertebrados, sendo também encontrado no ambiente, especialmente em locais contaminados com fezes (Songer, 1996). Entre os clostrídios, *C. perfringens* é considerado o principal causador de doença entérica nos animais domésticos, além de um importante patógeno para humanos.

Em aves domésticas, este agente causa enterite necrótica (EN), uma doença de grande importância na criação comercial, principalmente em frangos de corte, com maior acometimento de animais entre duas e três semanas de vida (Long, 1973). Os principais sinais clínicos da EN são desidratação, diarreia com odor fétido, apatia e diminuição da ingestão de alimentos. O intestino delgado é o mais gravemente acometido e se mostra friável, dilatado, com paredes finas e repleto de gás. Ocorre acúmulo de debris necróticos na mucosa e há formação de pseudomembrana de coloração entre amarelo e marrom ou tingida por bile. Lesões microscópicas incluem necrose das vilosidades intestinais e pode atingir as criptas. A membrana diftérica é caracterizada por células epiteliais degeneradas e necróticas e células inflamatórias envoltas por fibrina (Long *et al.*, 1974; Long e Truscott, 1976; Cooper e Songer, 2009). O *C. perfringens* pode ainda atingir o fígado, através dos ductos biliares, provocando colangiohepatite, caracterizada por lesões brancas neste órgão (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Estirpes de *Clostridium perfringens* são classificadas em cinco tipos (A, B, C, D e E), de acordo com a produção de quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota (Van Immerseel *et al.*, 2004). Na avicultura comercial, tanto em animais saudáveis quanto em casos de EN, o mais comum é o *C. perfringens* tipo A (produtor de toxina Alfa) e tipo C (produz toxinas

Alfa e Beta), que ocorre com menor prevalência. Os outros tipos aparentemente não tem importância em aves (Van Immerseel *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2007). Estirpes de *C. perfringens* de qualquer tipo podem produzir um fator de virulência adicional conhecido como toxina Beta2 (*cpb2*), cuja importância na patogenia da doença em aves não foi completamente elucidada (Asten *et al.*, 2010). Além disso, *C. perfringens* pode produzir também a enterotoxina (CPE), que apesar de associada à EN em galinhas e em um psitacídeo, tem seu papel na etiologia da doença ainda não determinado (Craven *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 2007). Recentemente, estudos demonstraram que uma toxina formadora de poros, conhecida como *Necrotic enteritis toxin B-like* (NetB), tem grande importância na patogenia da EN e sua presença quase sempre está associada à doença (Keyburn *et al.*, 2008).

Para tipificação de estirpes de *C. perfringens* um dos métodos mais utilizados é a PCR, visando a amplificação de genes codificantes das principais toxinas e fatores de virulência adicionais. Os principais genes alvo para diagnóstico são *cpa* (alfa), *cpb* (beta), *etx* (épsilon), *ia* (iota), *cpb-2* (beta-2), *cpe* (enterotoxina) e, mais recentemente, tem sido pesquisado o gene *netB* (NetB) (Vieira *et al.*, 2008; Keyburn *et al.*, 2008).

C. perfringens pode ser isolado de animais saudáveis e em vísceras e carcaças de frangos em abatedouros (Van Immerseel *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009). Este agente é um dos principais responsáveis por intoxicação alimentar em humanos, decorrente da produção da enterotoxina, havendo relação direta da fonte de infecção com a avicultura (Brynstad e Granum, 2002; Kessel *et al.*, 2001, citado por Van Immerseel *et al.*, 2004).

Em aves, um dos principais fatores predisponentes para o desenvolvimento da EN é a infecção por coccídeos (Van Immerseel *et al.*, 2004). Grupos parasitados por *Eimeria acervulina* e *E. necatrix* e que receberam alimento contendo *C. perfringens* tiveram taxa de óbito de 53,3 e 28,3%, respectivamente. A alimentação apenas contaminada provocou letalidade de 16%, enquanto os parasitos sozinhos não causaram mortalidade (Al-Sheikhly e Al-Saieg, 1979). Trabalhos com animais naturalmente infectados corroboram tais dados experimentais (Helmboldt e Bryant, 1971; Broussard *et al.*, 1986).

Há poucos estudos avaliando a susceptibilidade antimicrobiana de *C. perfringens* isolados de aves domésticas (Watkins *et al.*, 1997; Martel *et al.*, 2004; Chalmers *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Slavic *et al.*, 2011), sendo que nenhum destes abordou aves silvestres de vida livre ou de cativeiro, permanecendo desconhecido o perfil de resistência dos isolados dessas espécies.

Existem relatos esporádicos de EN em aves silvestres. *C. perfringens* foi relacionado a três episódios de alta mortalidade em quatro espécies de gansos de vida livre no Canadá, com achados macro e microscópicos típicos das infecções por esse microrganismo (Wobbeser e Raine, 1987). *C. perfringens* produtor de Beta toxina provocou a morte de 58 lorises (*Trichoglossus* spp.) de vida livre ao longo de 10 anos na Austrália (McOrist e Reece, 1992). Cinco corvos (*Corvus macrorhynchos*) de vida livre apresentaram quadro compatível com EN por *C. perfringens* tipo A (Asaoka *et al.*, 2004). A morte de um Tetrax (*Centrocercus urophasianus*) de vida livre foi associada à presença de *C. perfringens* tipo A em áreas de necrose intestinal (Hagen e Bildfell, 2007).

No México, quatro tucanos toco foram acometidos por EN fatal, apresentando sinais clínicos e achados de necropsia e microscópicos típicos da doença, com presença de áreas de necrose e hemorragia severas e aderência fibrinosa no fígado. Estruturas cocóides e bacilos Gram positivos, semelhantes a bactérias do gênero *Clostridium* estavam presentes nas lesões. Apesar do quadro típico de infecções por *C. perfringens*, não se chegou ao diagnóstico definitivo (Uribe *et al.*, 2008).

Com a carência de estudos envolvendo aves silvestres, não se sabe se este microrganismo faz parte da microbiota normal desses animais, tampouco quais são os genótipos comuns nessas populações. Além disso, há um completo desconhecimento com relação ao perfil de resistência de estirpes de *C. perfringens* isoladas dessas espécies de aves.

2.2.5. Endoparasitos

Ranfastídeos são particularmente susceptíveis à capilariose, que pode ser a principal causa de mortalidade dessas aves em cativeiro (Cubas, 2001). A abordagem taxonômica mais recente agrupa os sete gêneros que parasitam aves na subfamília Capillarinae, que or sua vez pertence à família Trichuridae. Ao contrário do amplamente difundido, não é possível classificar estes nematódeos em nível de espécie ou gênero pela visualização de ovos bioperculados. Assim, a expressão “capilarídeos” seria a generalização mais bem aceita quando se trata da visualização de ovos característicos em fezes ou raspados de mucosa gastrointestinal (Yabsley, 2008). Em tucanos e araçaris, as espécies identificadas são *Baruscapillaria obsignata* e *Capillaria venusta*, descritas como causadoras de alta mortalidade (Cubas, 2006; Yabsley, 2008).

Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem emaciação, apatia, anorexia, desidratação, diarreia sanguinolenta e anemia. À necropsia de animais que padecem dessa doença é observada enterite hemorrágica e presença de grande número de nematódeos aderidos à mucosa intestinal (Cubas, 2001). O controle desses parasitos é difícil, sugerindo que estes helmintos de ranfastídeos possam ser naturalmente mais resistentes, ter desenvolvido resistência aos anti-helmínticos mais usados, manter formas larvares na submucosa intestinal ou, ainda, que o rápido trânsito intestinal dos animais, diminui o tempo de exposição dos nematódeos aos medicamentos (Cubas, 2006).

Oocistos de *Eimeria* spp. são frequentemente detectados em aves assintomáticas. Doença clínica pode ocorrer sob diversas circunstâncias dependendo da idade do hospedeiro, presença de doença concomitante, imunossupressão e quando aves são mantidas sob condições sanitárias ruins e em recintos superpopulosos (Greiner e Ritchie, 1994; Cubas, 2001, Yabsley, 2008). Apesar de infecções por *Eimeria* spp. serem descritas como pouco patogênicas, sinais clínicos como redução na ingestão de água e alimentos, penas eriçadas, emaciação e diarreia com presença de sangue e muco são relatados (Yabsley, 2008). Duas espécies do gênero *Eimeria* foram descritas em tucanos. *Eimeria forresteri* foi identificada em vários grupos de tucano toco em cativeiro nos EUA, que apresentavam diarreia severa (Upton *et al.*, 1984). De um grupo de seis *R. vitellinus*, dois foram detectados liberando oocistos, que após esporulação, foram caracterizados e nomeados *E. vitellini* (Lainson *et al.*, 1990). Não há descrição de coccídeos do gênero *Isospora* sp. em ranfastídeos.

2.2.6. Ectoparasitos

Artrópodos da ordem Phthiraptera, subordem Mallophaga, juntamente com os ácaros plumícolas (Acari: Acaridida), são os ectoparasitos mais frequentemente encontrados nas aves. Apesar disso, pouco se sabe sobre seus efeitos na saúde destes animais (Valim *et al.*, 2005). A catação com o bico é essencial na prevenção do aumento da população de piolhos nas aves e do dano nas penas provocados por estes (Clayton *et al.*, 2005). Quanto maior o tamanho das populações ou a riqueza de espécies parasitando uma ave, maior será o tempo gasto no *grooming*, o que significa menos tempo destinado ao forrageamento, defesa do território e diminuição na vigília, facilitando o ataque de predadores (Cotgreave e Clayton, 1994; Clayton *et al.*, 2008). Um estudo recente demonstrou o impacto de piolhos mastigadores na perda de peso corporal e na diminuição da resistência a doenças em pássaros adultos (Hoi *et al.*, 2012). Aves de bicos longos (ex. Ramphastidae e Trochilidae) utilizam os pés para o *grooming* em maiores proporções do que aves de bicos curtos. Com isso, indivíduos de bico longo com deformidades nos membros inferiores apresentam maiores cargas de ectoparasitos (Clayton e Cotgreave, 1994). São descritas nove espécies de piolhos do gênero *Myrsidea* em ranfastídeos, sendo que sete foram encontradas em tucanos ou araçarís da fauna brasileira (Price *et al.*, 2004). De sete espécies de piolhos do gênero *Austrophilopterus* descritas em ranfastídeos na América Latina, apenas três foram encontradas em animais do território brasileiro (Price e Weckstein, 2005). Pesquisa por ectoparasitos resultou em negativa em um *R. toco* em cativeiro nos EUA (Nelder *et al.*, 2009) e *A. cancellosus* foi encontrado em 10 espécimes de *R. vitellinus* no zoológico de Sorocaba (Da Silva *et al.*, 2009).

2.2.7. Clamidiose aviária

A clamidiose aviária é uma doença contagiosa, sistêmica e comumente fatal, causada por *Chlamydophila psittaci*, uma bactéria de replicação obrigatoriamente intracelular, cujo ciclo apresenta duas formas de desenvolvimento: corpúsculo elementar (CE) e corpúsculo reticulado (CR). O CE pode sobreviver fora das células e o CR replica-se no citoplasma e é a forma predominante no ciclo (Andersen e Franson, 2007). Já foram detectadas mais de 460 espécies de aves suscetíveis em todos os continentes, exceto o antártico, assim, virtualmente todas as espécies de aves podem ser infectadas com *C. psittaci* (Kaleta e Taday, 2003).

É uma importante zoonose, havendo relatos de óbitos em decorrência da doença, que em humanos é denominada ornitose ou psitacose (Petrovay e Balla, 2008). Grupos funcionais de risco incluem pessoas que trabalham na criação e abate industriais de aves e em zoológicos (Raso *et al.*, 2008; Dickx *et al.*, 2010).

Após a entrada no organismo ocorre a infecção do epitélio e a bactéria pode ser encontrada principalmente nas fezes e secreções do trato respiratório, podendo sobreviver por longos períodos em material orgânico seco. O agente é regularmente transferido da faringe para as penas devido ao *grooming*. Assim, a principal forma de transmissão é por inalação ou ingestão de material contaminado. (Andersen e Vanrompay, 2003; Kaleta e Taday, 2003)

Os sinais clínicos da clamidiose são inespecíficos, como letargia, diminuição da ingestão de alimentos e penas arrepiadas. Pode haver corrimento nasal ou ocular de aspecto seroso ou mucopurulento, conjuntivite e excreção de uratos esverdeados ou amarelados (Smith *et al.*, 2010). Hepatomegalia e esplenomegalia com pontos brancos difusos e aerossaculite

fibrinopurulenta são as alterações de necropsia mais comuns. Achados histopatológicos incluem enterite hemorrágica subaguda, congestão renal e pulmonar, necrose multifocal hepática e esplênica com presença de células gigantes e granulócitos. Corpúsculos de inclusão podem ser vistos no citoplasma de macrófagos, hepatócitos e no endotélio capilar (Raso *et al.*, 2004; Andersen e Franson, 2007; Ecco *et al.*, 2009).

A instalação de doença clínica ou a mortalidade por *C. psittaci* depende da idade, espécie e imunidade da ave afetada, da patogenicidade do agente e fatores ambientais estressantes (Smith *et al.*, 2005). Alguns grupos de aves, como os Psittaciformes e Columbiformes podem se infectar com *C. psittaci* e não apresentar quadro clínico da doença e liberar o agente intermitentemente, adquirindo estado de portadoras (Raso *et al.*, 2002; Sharples e Baines, 2009).

Os métodos de diagnóstico mais utilizados são por detecção de anticorpos pelo método de fixação do complemento ou reação de imunofluorescência indireta, detecção do agente por isolamento bacteriológico ou ELISA, visualização direta por técnicas histológicas (imunohistoquímica) ou citológicas (coloração por Gimenez ou Macchiavello) e detecção de sequências do genoma, através da PCR (Smith *et al.*, 2010).

No Brasil, foi relatado um surto de clamidiose em 58 aves recolhidas do comércio ilegal, levando a uma taxa de mortalidade de 96,5% (Raso *et al.*, 2004). *Chlamydophila psittaci* e anticorpos contra o agente foram detectados em oito espécies do gênero *Amazona* mantidos em cativeiro (Raso *et al.*, 2002). Exposição e eliminação da bactéria foi demonstrada em araras azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) e em papagaio verdadeiro (*A. aestiva*) de vida

livre (Raso *et al.*, 2006). De 25 ranfastídeos testados, quatro tiveram anticorpos contra *C. psittaci*, no entanto, a PCR de *swab* cloacal não detectou o microrganismo (Raso *et al.*, 2005). Pela técnica de PCR de amostras de fígado, o patógeno não foi detectado em Cathartiformes, Falconiformes e Strigiformes de vida livre resgatados em Belo Horizonte (Andery, 2011).

Dentre as mais de 460 espécies diagnosticadas como portadoras de *C. psittaci*, apenas quatro espécies de ranfastídeos foram acometidas, incluindo duas espécies brasileiras (*R. toco* e *R. vitellinus*) mantidas em cativeiro na Europa e Ásia (Kaleta e Taday, 2003).

2.2.8. Doenças previstas no programa nacional de sanidade avícola

Em 1994, o então Ministro de Estado da Agricultura, Abastecimento e da Reforma Agrária, instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola, o PNSA. Com isso, foi criado o Comitê Consultivo do programa, cujas atribuições eram assessorar técnica e cientificamente o Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA) na avaliação do desempenho da avicultura nos setores privado e oficial, na confirmação e controle de focos da doença de Newcastle, Influenza Aviária e de outras doenças que interfiram no comércio interestadual e internacional e na saúde pública, nas metodologias de trabalho tanto ao nível laboratorial, como de defesa sanitária, na tomada de decisões de cunhos intervencionistas e sanitários e na avaliação de outros temas sempre que determinado. Instruções normativas subsequentes determinaram normas técnicas para controle e certificação de estabelecimentos avícolas como livres para *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*, assim como para as micoplasmoses aviárias por *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. meleagridis* (BRASIL, 2002).

2.2.8.1. Salmoneloses

As salmoneloses são causadas por bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete, do gênero *Salmonella*, família *Enterobacteriaceae*, possuem distribuição mundial e têm grande importância na saúde de humanos. Há cerca de 2500 sorovariedades baseadas na composição dos antígenos O (somático), Vi (capsular ou de virulência) e H (flagelar). A maioria das sorovariedades possui pouca especificidade e todas as espécies de aves são consideradas suscetíveis à salmonelose (Shivaprasad, 2003; Daoust e Prescott, 2007).

Salmonella spp. possuem importância em animais de cativeiro e podem ser introduzidas em coleções animais através de alimentos (principalmente carne e roedores), animais de vida livre ou por novas aquisições. Animais infectados podem se tornar portadores saudáveis, eliminando o agente nas fezes intermitentemente (Gopee *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado que criações de aves de fundo de quintal representam risco para aves silvestres de vida livre e em cativeiro (Butron e Brightsmith, 2010).

A transmissão da salmonelose ocorre principalmente pela via fecal-oral, pelo contato direto com animais infectados ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Na avicultura industrial, a transmissão vertical e através da casca do ovo também são importantes (García *et al.*, 2011).

A manifestação clínica da salmonelose é caracterizada por apatia, anorexia, desidratação, enterocolite aguda com diarreia, podendo ocorrer bacteremia, meningite com sintomatologia nervosa e morte súbita. Fatores como imunossupressão, a dose infectante, via de transmissão, espécie e idade acometida,

doenças concomitantes e sorotipo de envolvido tendem a determinar a ocorrência e a gravidade da doença (Friend e Franson, 1999). A enterite é caracterizada por congestão e ulceração, havendo acúmulo de material necrótico marrom escuro, decorrente da presença de sangue. Em Passeriformes, estas lesões podem envolver esôfago e papo e material necrótico fibrinopurulento pode estar presente. O fígado pode apresentar-se friável, aumentado de volume e com nódulos piogranulomatosos ou petéquias (Mikaelian *et al.*, 1997; Friend e Franson, 1999).

Segundo o PNSA, para proceder ao comércio nacional e internacional e à transferência, em âmbito nacional, de seus produtos, o núcleo ou estabelecimento avícola de reprodução deverá estar certificado como livre de *Salmonella* Gallinarum e Pullorum e livre ou controlado para *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium. Os testes para o monitoramento dos plantéis são: aglutinação rápida em placas (SAR), utilizando sangue total ou soro; aglutinação lenta em tubos (ALT) ou microaglutinação e diagnóstico bacteriológico. Para aves ornamentais ou silvestres de produção, devem ser adotados os mesmos critérios utilizados para matrizes. Todas as salmonelas isoladas deverão ser obrigatoriamente enviadas ao laboratório de referência de salmonelas aviárias para serem investigadas sob os aspectos epidemiológicos/microbiológicos (BRASIL, 2002).

A maioria das aves de vida livre portadoras não apresenta sinais clínicos e elimina este microrganismo por apenas algumas semanas, quando não reinfectadas. No entanto, gaivotas e pombos, aves que possuem contato mais próximo com humanos e dejetos urbanos ou rurais, possuem papel importante como carreadores e portadores de *Salmonella* spp. (Daoust e Prescott, 2007).

A salmonelose tem sido demonstrada como importante causa de mortalidade em aves de vida livre. Em uma região portuária no Japão, de 328 *swabs* cloacais submetidos à cultura de 55 espécies de aves diferentes, isolou-se *Salmonella* Typhimurium de 19 amostras e este sorotipo foi relacionado ao óbito de quatro animais (Kobayashi *et al.*, 2007). Na Escócia, *Salmonella* spp. foi relacionada ao óbito de diversas espécies de aves de vida livre e pode ser uma das possíveis causas do preocupante declínio de populações de pardais (*Passer domesticus*) (Pennycott *et al.*, 2006). Na Noruega, grande número de espécimes e espécies de aves foi acometido por *Salmonella* Typhimurium e a maioria dos óbitos ocorreu nos meses mais frios do ano (Refsum *et al.*, 2002). De um total de 3472 eventos de mortalidade em aves de vida livre nos Estados Unidos, 186 foram relacionados a infecções por *Salmonella* spp., o que acarretou na morte de 68000 animais em um período de 10 anos (Hall e Saito, 2008)

No Brasil foi relatada a morte de araras azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por *Salmonella* Typhimurium (Menão *et al.*, 2000). No Zoológico do Rio de Janeiro foi descrita a ausência de isolamento de *Salmonella* sp. em uma amostragem de *swabs* cloacais de 78 aves selvagens de 21 espécies (Lemos *et al.*, 1999). *Salmonella* sp. não foi detectada em *swabs* cloacais e cultivo bacteriano de 200 aves selvagens no estado de São Paulo (Lopes, 2008).

Aves silvestres de vida livre tem sido detectadas com anticorpos contra *Salmonella* Pullorum. No México, 201 pombos silvestres foram testados por soroaglutinação rápida, ocorrendo 53 animais sororeagentes (Espinosa-Arguelles *et al.*, 2010). Uhart *et al.* (2003) encontraram petréis de vida livre na Patagônia reagentes, assim como Deem *et al.* (2005) detectaram papagaios verdadeiros de vida livre e de cativo reagentes para *Salmonella*

Pullorum. Cracídeos e tinamídeos de cativo em Minas Gerais foram sororeagentes à SAR (62/225), no entanto não houve o isolamento de *Salmonella* spp. de *swabs* cloacais (Marques, 2010).

Em um zoológico norte americano, de 22 tucanos do bico preto (*Ramphastos vitellinus*) amostrados, houve isolamento de *Salmonella* spp. em dois animais, sendo identificados os sorovares *Salmonella* Javiana e *Salmonella* Rubislaw (Gopee *et al.*, 2000). *Salmonella* sp. foi relatada como causadora de doença em tucanos de cativo no Brasil, no entanto, maiores detalhes não foram fornecidos (Cubas, 2006).

2.2.8.2. Micoplasmoses

Micoplasmas são bactérias de formato cocóide, cocobacilar ou pleomórficas, Gram negativas, mas que se coram pelo Giemsa. Há cerca de 100 espécies de *Mycoplasma* descritas e 23 destas são relacionadas às aves, sendo mais importantes em aves domésticas o *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) e *Mycoplasma iowae* (MI) (Kleven, 2003).

Os sinais clínicos da infecção por MG são respiratórios, diminuição na ingestão alimentar e produção de ovos e baixa eclodibilidade. A doença clínica por MS causa sinais semelhantes, porém de forma mais branda, podendo não haver sinais respiratórios, sendo que este microrganismo causa claudicação com aumento de volume nos membros inferiores. A maioria dos sinais clínicos provocados por MM é leve ou inaparente, sendo observada baixa eclodibilidade e aumento de mortalidade embrionária. As micoplasmoses possuem transmissão horizontal, através de aerossóis, água, alimento, fômites contaminados e pelo contato direto com animais infectados. A transmissão vertical

ocorre através da contaminação do ovo no oviduto (Nascimento *et al.*, 2005). Em Passeriformes, os sinais clínicos mais comuns são conjuntivite, de moderada à severa, uni ou bilateral, sinusite infra orbital com descarga nasal e ocular variando de serosa a crostosa. A infecção pode levar à apatia, perda de peso e ao óbito (Luttrell *et al.*, 1996; Mikaelian *et al.*, 2001).

Para adequação ao PNSA, estabelecimentos avícolas devem estar sob vigilância permanente ou eventual e seus plantéis livres de MG, MS e MM. O teste da soroaaglutinação rápida em placas (SAR) é realizado para triagem e os soros reagentes devem ser submetidos ao teste de ELISA ou inibição da hemaglutinação (IH) para confirmação. Havendo casos de positividade, *swabs* de traquéia devem ser coletados e enviados para laboratórios oficiais para a realização de PCR. Em criações de aves silvestres ou ornamentais são adotados os mesmos critérios para matrizes, cuja vigilância é eventual, com repetição dos exames a cada três meses (Brasil, 2002). Recentemente, técnicas de PCR para o gênero tem sido utilizadas, tendo em vista a ampla distribuição de diferentes espécies de *Mycoplasma* encontradas em aves domésticas e silvestres (Lierz *et al.*, 2007). A subsequente identificação da espécie do agente é realizada por sequenciamento do fragmento amplificado.

Infecção natural por MG e MS foi detectada em pombos domésticos assintomáticos e em codornas japonesas com sinais respiratórios e locomotores e em embriões (Benčina *et al.*, 1987). Patos criados em contato com galinhas portadoras, eliminavam MG e MS sem apresentar sinais clínicos das doenças ou títulos detectáveis de anticorpos. Este estudo ainda comprovou a transmissão vertical, havendo o isolamento destes agentes etiológicos em embriões com diferentes tempos de mortalidade (Benčina

et al., 1988). A presença de *Mycoplasma gallisepticum* tem sido demonstrada em várias espécies de aves silvestres, havendo um grande número de espécies de pássaros diagnosticados como portadores (Farmer *et al.*, 2005). Há relatos de surtos de micoplasmose, provocando quadros de conjuntivite com taxas variadas de letalidade no Canadá (Mikaelian *et al.*, 2001) e Estados Unidos (Luttrell *et al.*, 1996) e como achado incidental de necropsia na Escócia (Pennycott *et al.*, 2005) em várias espécies de Passeriformes. Em Falcão Peregrino (*Falco peregrinus*), MG foi isolada e pode ter sido veiculada por pintinhos que eram usados na alimentação de rapinantes no centro de reabilitação em questão (Poveda *et al.*, 1990). Entretanto, não foram detectados anticorpos para MG em Cathartiformes, Falconiformes e Strigiformes de vida livre resgatados em Belo Horizonte (Andery, 2011), tampouco em cracídeos e tinamídeos (Marques, 2010).

No Brasil, MG foi detectado, por meio de PCR, em cinco espécies de psitacídeos brasileiros submetidos à necropsia em decorrência de diversos acometimentos (Gomes *et al.*, 2010). De 24 Passeriformes de cativeiro avaliados, sete foram positivos para *Mycoplasma* spp., acometendo quatro espécies de aves diferentes (Duarte *et al.*, 2006).

2.2.8.3. Doença de Newcastle

A doença de Newcastle (DN) é causada pelo Paramyxovirus aviário tipo 1 (APMV-1), um vírus envelopado, RNA de fita simples, que infecta aves domésticas e silvestres. Em galinhas, infecções pelas formas virulentas do vírus podem causar três manifestações clínicas distintas: viscerotrópica velogênica, provocando morte aguda, com lesões hemorrágicas intestinais; neurotrópica velogênica, com sinais clínicos neurológicos e respiratórios com alta mortalidade e usualmente sem

manifestação intestinal; ou a forma mesogênica, de forma clínica semelhante à anterior, porém com baixa mortalidade. A transmissão se dá pela eliminação do agente nas fezes e fluidos. É uma zoonose, causando infecções oculares, com eritema, lacrimação excessiva, edema de pálpebras, conjuntivite e hemorragia subconjuntival. As fontes de infecção para os humanos são os vírus vacinais ou através de conteúdo infectado de aves doentes (Alexander, 2003; Miller *et al.*, 2010).

Monitoramento e medidas de controle devem ser adotados acerca de estirpes virulentas (mesogênicas e lentogênicas) mesmo nos vários países onde são endêmicas, devido ao risco de provocarem grandes prejuízos na avicultura comercial (Miller *et al.*, 2010). No Brasil, o PNSA estabelece normas de biossegurança, vacinação e sacrifício de animais portadores de APMV-1. O teste sorológico considerado padrão é a Inibição da Hemaglutinação (IH), no entanto a imunodifusão também pode ser utilizada. O isolamento em ovo e a RT-PCR é realizada para a detecção do vírus, sendo assim, os testes confirmatórios (BRASIL, 2002). Para a confirmação da patogenicidade dos vírus isolados, os métodos do Índice de patogenicidade intracerebral e, mais recentemente, a caracterização genética, são os mais utilizados (Alexander, 2003).

É uma das doenças de maior importância econômica para a avicultura mundial, sendo de notificação obrigatória junto à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Surto da doença são ameaças constantes ao redor do planeta (Gilchrist, 2005; Miller *et al.*, 2010).

Pelo menos 241 espécies de aves, de 27 das 50 ordens existentes foram infectadas, natural ou experimentalmente, pelo APMV-1. Com isso, pode-se considerar que todas, ou a maioria das aves, são suscetíveis ao

vírus (Leighton e Heckert, 2007). Na França, 10 de 54 biguás (*Phalacrocorax carbo*) foram positivos à IH, além disso, essa espécie havia sido relacionada a surto de DN na avicultura comercial na Escócia (Artois *et al.*, 2002). No Canadá, sorologia positiva para o APMV-1 e isolamento de vírus de alta patogenicidade foi relacionado a sinais clínicos de DN em aves aquáticas. biguás (*Phalacrocorax auritus*) apresentavam paralisia unilateral na asa ou perna e não conseguiam voar. Pelicanos (*Pelecanus erythrorhynchos*) afetados estavam fracos e incapazes de voar e gaivotas (*Larus spp.*) não apresentavam sinais clínicos. (Wobeser *et al.*, 1993). Na Nigéria, 21 falcões de cativeiro (*Falcon biarmicus abyssinicus*) de 37 testados apresentaram titulação igual ou maior a 1:40 à HI (Okoh, 1979).

Um estudo no Rio de Janeiro, utilizando 837 amostras de plasma de galinhas não vacinadas contra o AVMP-1 e aves de zoológico, encontrou 1,43% de positividade à IH. Das aves silvestres, três carcarás (*Caracara plancus*), uma urubutinga (*Buteogallus urubutinga*) e uma coruja burauqueira (*Athene cunicularia*) foram soropositivas (Oliveira Jr *et al.*, 2003). Seis pombos domésticos, de 109 pesquisados foram positivos para o VDN (Sousa *et al.*, 2010). Em outro estudo, perdizes (*Rhynchotus rufescens*) infectadas com estirpes de alta patogenicidade eliminaram o vírus por até 15 dias, provocando 100% de mortalidade em galinhas alojadas com esses animais (Paulillo *et al.* 2005). Foram detectados anticorpos (IH) em 2,4% (2/68) *Caracara plancus* resgatados em Belo Horizonte (Andery, 2011) e em 15,38% (20/130) cracídeos mantidos em cativeiro em Minas Gerais, não havendo soropositividade em tinamídeos cativos no mesmo estado (Marques, 2010).

Vírus viscerotrópico velogênico da doença de Newcastle foi isolado em três tucanos de 48 pesquisados, oriundos de criadores,

comerciantes e de importadores nos Estados Unidos. Testes de IH foram realizados em 20 animais e não foram detectados anticorpos contra o APMV-1 (Pearson e McCann, 1975).

Apesar de testes sorológicos não fornecerem informações sobre a estirpe do vírus da DN, pesquisas em populações selvagens são importantes para conhecer a circulação do agente entre esses animais (Leighton e Heckert, 2007).

OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar o estado sanitário de tucanos e araçarís em cativeiro no estado de Minas Gerais, através de pesquisas para agentes infecto-parasitários selecionados, assim como pesquisou a presença de anticorpos contra etiologias infecciosas importantes na avicultura comercial.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de hemoparasitismo, com enfoque na caracterização molecular de hemosporídeos;
- Verificar a presença de *Clostridium perfringens*, realizando genotipagem dos isolados, e testes de susceptibilidade antimicrobiana;
- Identificar a presença de endo e ectoparasitos;
- Detectar a presença de parte do genoma de *Chlamydia psittaci* em amostras biológicas de ranfastídeos;
- Detectar a presença de anticorpos contra *Salmonella Pullorum*., *Mycoplasma gallisepticum* e contra o Vírus da Doença de Newcastle.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais e período de execução do projeto

Foram coletadas amostras de sangue e *swabs* cloacais de 144 ranfastídeos em mantenedores de fauna, jardins zoológicos, clínica veterinária e centros de triagem de animais silvestres no estado de Minas Gerais. O período das coletas foi entre maio de 2010 e outubro de 2011. Os locais de coleta e a descrição dos indivíduos estudados estão na tabela 1.

As amostras e eventuais necropsias foram processadas no Setor de Doenças das Aves e no Laboratório de Anaerobioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA/UFMG) registrado no protocolo 014/11 e no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade com o protocolo 24619-1 (Anexos).

A tabela 2 contém a distribuição numérica das espécies de ranfastídeos de acordo com cada teste realizado.

4.2. Contenção, avaliação das aves e coleta de ectoparasitos

As aves foram contidas fisicamente, com auxílio de puçás. Foi realizado exame clínico, para a verificação da condição corporal e de alterações anatômicas nos animais. Ectoparasitos e penas parasitadas foram coletados e acondicionados em frascos contendo álcool 70%.

Tabela 1: Distribuição dos indivíduos amostrados de acordo com a instituição mantenedora.

Local de coleta	RT	RD	RV	Rtuc	<i>Pteroglossus</i> sp.	SM	TOTAL
CETAS BH	37						37
CETAS MOC	1						1
CPC*	10	14	9		4	4	41
PETI	2						2
FZ BH	2			1			3
FZ MOC	3						3
HOVET AC	11						11
MF Belvedere**				3	4		7
MF Bem Viver	1						1
MF Mozart	1						1
MF Veredas***	9			2	3		14
MF WR	7	5		2			14
FVV	4	4		1			9

RT = *Ramphastos toco*; RD = *R. dicolorus*; RV = *R. vitellinus*; Rtuc = *R. tucanus*; SM = *Selenidera maculirostris*.

CETAS BH = Centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte; CETAS MOC = Centro de triagem de animais silvestres de Montes Claros; CPC = Criadouro Poços de Caldas; PETI = Estação Ambiental de PETI – São Gonçalo do Rio Abaixo; FZ BH = Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte; FZ MOC = Fundação Zoobotânica de Montes Claros; HOVET AC = Hospital Veterinário Animal Center – Belo Horizonte; MF = Mantenedouro de fauna; Belvedere - Belo Horizonte; Bem Viver - Betim; Mozart - Esmeraldas; Veredas - Juatuba; FVV = Fazenda Vale Verde - Alambique e parque ecológico - Betim.

* - Espécies de *Pteroglossus* são: *P. bitorquatus* (2), *P. castanoti* e *P. bailloni*.

** - Espécies de *Pteroglossus* são: *P. aracari* (2) e *P. inscriptus* (2).

*** - Apenas *P. aracari*.

Tabela 2: Distribuição numérica das espécies estudadas de acordo com cada teste realizado.

Espécie	PCR/ Hp	<i>C.perfr.</i>	Endopar.	Ectopar.	<i>C.</i> <i>psittaci</i>	MG e SP	IH/ VDN
<i>Ramphastos toco</i>	87	74	75	88	81	69	69
<i>R. dicolorus</i>	23	21	19	23	21	16	16
<i>R. tucanus</i>	9	9	9	9	7	8	8
<i>R. vitellinus</i>	9	9	9	9	9	7	7
<i>Pteroglossus aracari</i>	5	5	3	5	5	2	2
<i>P. inscriptus</i>	2	2	2	2	2	0	0
<i>P. bitorquatus</i>	2	2	0	2	2	0	0
<i>P. castanoti</i>	1	1	1	1	1	0	0
<i>P. bailloni</i>	1	1	1	1	1	0	0
<i>Selenidera maculirostris</i>	4	4	4	4	4	0	0
Total	143	128	123	144	133	103	103

PCR/Hp = Pesquisa de hemoparasitos por PCR.

C. perfr = Pesquisa de *Clostridium perfringens*.

Endopar. = Pesquisa por endoparasitos em amostras de fezes.

Ectopar = Pesquisa por ectoparasitos. Reflete o número total de animais avaliados

C. psittaci = PCR para pesquisa de *C. psittaci* em swabs cloacais.

MG e SP = Soroaglutinação Rápida em Placa para *Salmonella Pullorum* e para *M. gallisepticum*.

HI/VDN = Inibição da hemaglutinação para vírus da Doença de Newcastle

4.3. Coletas de sangue e *swabs* cloacais

Amostras de sangue, entre 3 e 5mL, dos tucanos foram coletadas por punção da veia ulnar com agulhas e seringas estéreis descartáveis. Foram confeccionados dois esfregaços sanguíneos e três gotas de sangue foram acondicionadas em microtubos contendo 30 µL de EDTA 0,5mM e posteriormente congeladas. O restante do material foi mantido em refrigeração (4°C/12 horas) e centrifugado (2000g/10 minutos) para separação do soro, o qual foi alíquotado em microtubos e armazenado sob refrigeração e/ou congelado para posterior análise. Dos arcares foram coletados cerca de 0,5mL de sangue, o suficiente para a confecção dos esfregaços sanguíneos e estocagem em EDTA.

Foram coletados dois *swabs* cloacais com hastes flexíveis estéreis por ave. Um *swab* foi colocado em microtubo contendo 400µL de TEN (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,9% NaCl), transportado em caixa isotérmica com gelo reciclável (± 4 °C) até o laboratório, aonde a amostra foi vigorosamente vortezada (cerca de 1min) e a haste com o algodão foi retirada com auxílio de ponteira autoclavada. O outro *swab* foi acondicionado em microtubo seco e transportado em caixa isotérmica com gelo reciclável até o laboratório. Estes microtubos foram armazenados em freezer a -20 °C até o processamento.

4.4. Exames coproparasitológicos

Foram coletadas excretas de indivíduos ou pools de fezes de viveiros coletivos em frascos plásticos estéreis e as excretas foram armazenadas em refrigeração até o momento da realização dos exames. Foram utilizados os métodos de microscopia direta a fresco em preparação úmida (NaCl 0,9%) de lâmina e lamínula e o método de flutuação espontânea em solução de cloreto de sódio (densidade 1,20) com formação de

menisco no frasco e sobreposição de uma lâmina (15-20 minutos). As lâminas foram analisadas em toda sua extensão sob objetiva de 10X e formas suspeitas visualizadas em objetiva de 40X em microscópio óptico (Olympus, Japão).

4.5. Necropsia dos animais

Animais que foram recebidos em óbito no Setor de Doenças das Aves foram necropsiados segundo técnica descrita por Matushima (2007). Na necropsia foram coletados: ectoparasitos (álcool 70°) e penas para pesquisa de ectoparasitos em lupa e microscopia óptica; fragmentos de órgãos como fígado, baço, traquéia e pulmão foram congelados a -20°C para posterior extração de DNA; conteúdo intestinal, por raspado da mucosa, foi analisado em microscopia óptica, para a detecção de endoparasitos e ovos de parasitos, oocistos ou outras etiologias.

4.6. Extração e quantificação do DNA de *swabs* e tecidos

A extração de DNA do *swab* cloacal e dos tecidos foram realizadas segundo Boom *et al.* (1990) com algumas modificações. Cerca de 200mg (ou 200 µL) do material bruto (ou órgão previamente macerado) foram adicionados com 600µL de solução iodeto de sódio (NaI) em um microtubo. Esta mistura foi incubada a 55°C por 30 minutos, sofreu leve agitação a cada 10 minutos, seguido de centrifugação por 4 minutos a 5000 rpm. O líquido (NaI + DNA) foi então coletado com pipeta e transferido para outro microtubo contendo 50µL de suspensão de sílica. O material foi homogeneizado com o auxílio de um vortex e posteriormente incubado em agitador por 10 minutos a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados por 30 segundos a 14000rpm e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O sedimento foi suspenso em 800µL de NaI e rapidamente homogeneizado. A mistura foi centrifugada por 30 segundos a

14000rpm, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido. O sedimento foi lavado com 1mL de tampão de lavagem mantida a -20°C (etanol absoluto; 1M Tris-HCl pH 8,0; 0,5M EDTA pH 8,0; água MiliQ) e após centrifugação por 30 segundos a 14000rpm, o sobrenadante foi descartado. Este processo de lavagem foi realizado por três vezes. Ao sedimento lavado foi adicionado 1mL de acetona P.A. (-20°C) e, após homogeneização no vortex e centrifugação por 30 segundos a 14000rpm, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento mantido a 50°C por 10 minutos. O DNA aderido à sílica (sedimento) foi eluído em 70µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e incubado a 50°C por 10 minutos. O tubo foi centrifugado por 2 minutos a e o sobrenadante (DNA total) foi transferido para outro microtubo e estocado a -20°C até o uso.

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Fischer, Estados Unidos) utilizando 1µL da amostra de interesse.

4.7. Pesquisa de hemoparasitos

4.7.1. Extração de DNA de sangue

Das amostras de sangue armazenados em EDTA, 30µL foram adicionados em microtubos contendo 300µL de solução de lise celular (Promega®, MA, EUA), ficando armazenado sob refrigeração por dois dias para posterior extração de DNA, que foi realizada com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega® MA, EUA). O conteúdo foi vigorosamente homogeneizado e centrifugado à 14000rpm por 1,5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300µL de solução de lise celular. O mesmo processo era repetido até que o material precipitado ficasse limpo. Após o último descarte do sobrenadante, foram adicionados 20µL de

solução de lise nuclear e 1,5µL de RNase. Após incubação do material a 37 °C por 15 minutos em banho-maria, foi adicionado 100µL de solução precipitadora de proteína. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e centrifugadas a 14000rpm por três minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos contendo 150µL de isopropanol P.A. Os tubos foram invertidos por 30 vezes, até o aparecimento do DNA e foi centrifugado a 1400rpm por um minuto. Após o descarte do sobrenadante, 150µL de álcool 70% foi adicionado ao tubo, que foi invertido gentilmente por 15 vezes. Posteriormente, o tubo foi centrifugado à 14000 rpm por um minuto, o sobrenadante foi descartado e o excesso retirado em papel toalha descartável. Após a secagem em estufa a 37 °C, o precipitado foi eluído em 35µL de solução de re-hidratação de DNA (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado sob congelamento.

Dos animais que foram recebidos em óbito foi extraído DNA de amostras de baço pelo método de sílica descrito anteriormente.

4.7.2. PCR de diagnóstico e confirmação em esfregaço sanguíneo

Para pesquisa de hemosporídeos, foi realizada PCR para amplificação de uma região altamente conservada do gene SSU rRNA mitocondrial segundo Fallon *et al.* (2003). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados foram:

343F: 5'- GCTCACGCATCGCTTCT- 3'

496R: 5'- GACCGGTCATTTTCTTTG- 3'

Na reação de amplificação, cada tubo recebeu 2 µL do "DNA - molde" e 13 µL de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; (Phoneutria®); 1,5 mM MgCl₂; 0,16 µM dNTP; 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,2mM de cada iniciador e água ultra pura estéril qsp.

O programa da amplificação em termociclador (Maxygene, Axygen, Estados Unidos ou PT100, MJ Research, Estados Unidos) consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 3 min., finalizando com temperatura de 4°C. Os controles positivos utilizados nas reações de PCR compreenderam de DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* obtidos de pintinhos experimentalmente infectados, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR, Belo Horizonte. Os controles negativos foram amostras de DNA obtidas de pintinhos mantidos livres de infecção na Escola de Veterinária da UFMG.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, em tampão TBE 1X. O gel foi fixado em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA evidenciados em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Das aves examinadas, foram confeccionados dois esfregaços sanguíneos. As lâminas foram secas imediatamente ao ar, fixadas em metanol e coradas com Giemsa (Valkiūnas, 2005). As lâminas dos animais positivos à PCR foram avaliadas para confirmação do diagnóstico. Toda a lâmina foi avaliada em aumento de 40X, 100 campos microscópicos foram examinados em aumento de 100 e 400X e a parasitemia foi avaliada em 100 campos sob aumento de 1000X.

4.7.3. PCR para sequenciamento

As amostras dos animais positivos na PCR de diagnóstico foram submetidas à *Nested-PCR* descrita por Hellgren *et al.* (2004) que amplifica um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade c (*cyt-b*) (Figura 1). Os *primers* utilizados foram:

HaemNFI → 5'-
CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'

HaemNR3 → 5'-
ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-
3'

HaemF → 5'-
ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3'

HaemR2 → 5'-
GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'

Para a primeira reação de amplificação, cada tubo recebeu 2 µL do “DNA -molde” e 23 µL de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; (Phoneutria®); 1,5 mM MgCl₂; 0,125 mM dNTP; 5U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,4mM dos iniciadores HaemNFI e HaemNR3 e água ultra pura estéril qsp. O programa da primeira reação consistiu em 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 minutos e a extensão final a 72°C por 10 minutos, finalizando com temperatura de 4°C. Posteriormente, 3 µL do produto previamente amplificado foi misturado a 22 µL do tampão da segunda reação que é semelhante ao tampão da primeira reação, pela exceção de que os iniciadores utilizados foram o HaemF e HaemR2, na mesma concentração. A segunda reação consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de

anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 minutos e a extensão final a 72°C por 10 minutos, finalizando com temperatura de

4°C. A revelação dos produtos ocorreu à mesma maneira da PCR de diagnóstico.

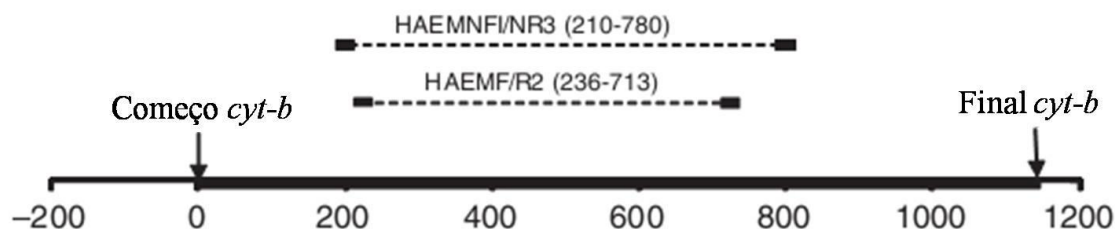


Figura 1: Desenho esquemático da região do gene mitocondrial *cyt-b* de *Plasmodium/Haemoproteus* amplificada na Nested-PCR do presente estudo (Adaptado de Bensch *et al.*, 2009).

4.7.4. Purificação dos produtos da PCR com polietileno glicol (PEG)

O método utilizado para a purificação do DNA é o descrito por Sambrook *et al.* (2001), com modificações. Aos produtos de duas Nested-PCR (50µL) foi adicionado igual volume de uma solução à 20% de PEG 8000. Após agitação por 15 segundos, a mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C e centrifugada por 15 minutos a 13000g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de pipeta e descartado. Sobre o sedimento foram adicionados lentamente, e pelas paredes do tubo, 125µL de etanol 80%. Após a lavagem do sedimento e centrifugação por 5 minutos, a lavagem foi repetida. Após descartar o sobrenadante por inversão, o tubo foi incubado a 37°C para secagem do etanol. Foi adicionado 15 µL de água Milli-Q estéril e o sedimento foi suspenso por pipetagem. Parte do DNA purificado (2 µL) foi visualizado em luz UV após eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão de corrida TBE 0,5X e o restante foi conservado a -20°C até sua utilização.

4.7.5. Reação de sequenciamento e análise filogenética

O DNA purificado foi sequenciado pelo método de dideoxinucleotídeos em sequenciador automático capilar ABI 310® (Perkin Elmer, Estados Unidos), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 2 µL do produto de PCR purificado foi utilizado em cada reação, adicionando 1 µL dos iniciadores HaemF e HaemR2 na concentração de 10 pmol em microtubos separados, 1 µL de Big Dye, 1,5 µL de tampão Save Money (Applied Biosystems, EUA) e água milliQ em quantidade suficiente para 10 µL. Esta reação foi feita em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., EUA), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento do iniciador a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, sendo esse ciclo repetido por 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida, sendo então feita a desnaturação rápida a 95°C por 2 minutos e colocado no gelo

imediatamente. Os produtos foram sequenciados no laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A qualidade dos eletroferogramas gerados foi verificada através do programa Sequencher 4.10.1, onde as sequências foram alinhadas. A edição foi realizada no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2012). Os valores de divergência genética entre as linhagens foram calculados utilizando o software MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2012). As relações filogenéticas entre as linhagens foram estimadas por meio de inferência bayesiana utilizando o software MrBayes v3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Nestas análises, duas cadeias de Markov foram implementadas simultaneamente por 2500000 gerações com amostragem a cada 100 gerações atingindo um total de 25000 árvores cada. As árvores remanescentes (após a implementação da abordagem de “burn-in”) foram utilizadas para calcular as probabilidades *a posteriori* dos cladogramas recuperados e utilizados como medidas de suporte. Para comparação, todas as morfospécies, cujos haplótipos estão descritos no banco de dados MalAvi (Bensch *et al.*, 2009) foram utilizadas. *Haemoproteus columbae* foi aplicado como grupo externo.

4.8. *Clostridium perfringens*

4.8.1. Isolamento e genotipagem

Para o isolamento, os *swabs* mantidos à seco foram estriados em Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS, Difco Laboratories, Detroit, USA). As placas foram incubadas em ambiente de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Posteriormente, colônias negras, decorrente de reação sulfito redutora, foram coletadas com alças microbiológicas estéreis e suspensas em 400µL de água Milli-Q estéril. O DNA foi extraído termicamente a

98°C, por 20 minutos, sem posterior purificação, segundo Baums *et al.*(2004). As amostras de DNA foram estocadas a 4°C até a realização da PCR.

Genes codificantes da toxina beta-2 (*cpb2*), enterotoxina (*cpe*) e as principais toxinas de *C. perfringens* (alfa, beta, épsilon e iota) foram pesquisados por uma PCR multiplex de acordo com Vieira *et al.* (2008). O gene codificante da toxina NetB foi testado separadamente em uma PCR monoplex, de acordo com Keyburn *et al.* (2008). Como controles positivos das reações foram usadas as seguintes amostras de referência, cedidas pelo *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland, EUA): *C. perfringens* tipo A (ATCC 3624), *C. perfringens* tipo B (ATCC 3626), *C. perfringens* tipo C (ATCC 3628), *C. perfringens* tipo D (ATCC 3629) e *C. perfringens* tipo E (ATCC 27324). Na reação de amplificação, cada tubo recebeu uma mistura de tampão de 25 µL, contendo: 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; (Phoneutria®); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 5 U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,5 µM de cada iniciador; 5 µL de DNA extraído e água MilliQ estéril autoclavada em q.s.p. O programa das amplificações da PCR multiplex consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C, por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (95°C por 1min, 48°C por 1min, 72°C por 1min). A extensão final a 72°C foi de 10 minutos. As amplificações foram realizadas em termociclador automatizado (Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a análise, 10µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), corados com brometo de etídeo (10mg/mL), submetidos à eletroforese e visualizados em luz UV. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR multiplex estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores utilizados na PCR Multiplex para tipificação de *Clostridium perfringens*

Toxina (Genes)	Seqüência	Tamanho do fragmento	Referência
Alfa (<i>cpa</i>)	F - 5` -GCTAATGTTACTGCCGTTGA- 3` R - 5` -CCTCTGATACATCGTGTAAG- 3`	324 bp	Meer <i>et al.</i> , 1997
Beta (<i>cpb</i>)	F - 5` -GCGAATATGCTGAATCATCTA- 3` R - 5` -GCAGGAACATTAGTATATCTTC- 3`	196 bp	Meer <i>et al.</i> , 1997
Epsilon (<i>etx</i>)	F - 5` -GCGGTGATATCCATCTATTC- 3` R - 5` -CCACTTACTTGTCTACTAAC- 3`	655 bp	Meer <i>et al.</i> , 1997
Iota (<i>iA</i>)	F - 5` TTTTAACTAGTTCATTTCTAGTTA 3` R - 5` TTTTGTATTCTTTTTCTCTAGATT 3`	298 bp	Perelle <i>et al.</i> , 1993
Enterotoxina (<i>cpe</i>)	F - 5` -GGAGATGGTTGGATATTAGG- 3` R - 5` -GGACCAGCAGTTGTAGATA- 3`	233 bp	Meer <i>et al.</i> , 1997
Beta2 (<i>cpb2</i>)	F - 5` -GAAAGGTAATGGAGAA- 3` R - 5` -GCAGAATCAGGATTTT- 3`	573 bp	Herholz <i>et al.</i> , 1999

Para a PCR visando a detecção do gene *netB* os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram:

AKP78

5' - GCTGGTGCTGGAATAAATGC- 3'

AKP79

5' - TCGCCATTGAGTAGTTTCCC- 3'

A reação foi realizada em um tampão de 25 µL contendo: 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; (Phoneutria®); 2,5 mM MgCl₂; 2,5 mM dNTP; 2,5 U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 50 pM de cada iniciador; 5 µL de DNA extraído e água MiliQ estéril autoclavada em q.s.p. O programa no termociclador consistiu em desnaturação inicial à 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos e extensão à 72°C por um minuto; e extensão final à 72°C por 12 minutos. Ao término da reação, a temperatura de manutenção foi de 4°C. Os produtos foram revelados à mesma forma da PCR multiplex.

4.8.2. Susceptibilidade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em ágar, de acordo com recomendações do CLSI (2011). Diluições seriadas dobrando a concentração a partir de 0,25mg/L foram realizadas. Os antibióticos testados foram: penicilina, lincomicina, oxitetraciclina, eritromicina, vacomicina e metronidazol. Para cada antimicrobiano testado a CIM₅₀ e CIM₉₀, ou seja, a concentração mínima que inibiu 50 e 90% das amostras, respectivamente, foram calculadas. *Bacteroides fragillis* (ATCC 25285) foi utilizada como amostra controle.

4.9. PCR para *Chlamydomphila psittaci*

A reação de PCR para detecção de *C. psittaci* seguiu o protocolo de Sachse *et al.* (2009) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos abaixo:

C. psittaci F: 5'- ACTACGGAGATTATG TTTTCGATCGTGT-3'

C. psittaci R: 5'- ACGAATTCCTAGGT TCTGATAGCGGGAC -3'

Uma alíquota de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 20µL contendo: 200ng de DNA, 2µL de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen®), 1µL de dNTP 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen®), 1µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen®), 1µL de cada iniciador externo a 10Mmol, 0,1µL de Taq Polimerase 5U/µL (Phoneutria®) e água ultra pura qsp. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Axygen® (Maxygene). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 60 segundos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 51°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 4 minutos. Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de amostra de tecido de ave com diagnóstico para *C. psittaci* confirmado em outros laboratórios.

A análise dos resultados das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 10mg/mL e revelado em luz UV. Em 10µL de cada produto amplificado, foram adicionados 3µL do tampão corante (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol) de amostra a 2X. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1% e submetida à eletroforese a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico).

4.10. Soroaglutinação rápida em placa (SAR) para *Salmonella Pullorum* e *M. gallisepticum*

Os soros foram testados individualmente com antígenos coloridos comerciais para *S. Pullorum* (PULOR TESTE – Biovet®) e *M. gallisepticum* (MYCO-GALLI TESTE – Biovet®) autorizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento) conservados sob refrigeração (2°C a 8°C). Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (Brasil, 2001), observando a metodologia analítica preconizada pelo fabricante dos antígenos. Soros conhecidos não reagentes e reagentes de referência para *S. Pullorum* e *M. gallisepticum* foram utilizados como controle..

O teste foi realizado em uma placa de vidro subdividida em 50 quadrados de 2,5 x 2,5cm, utilizando 50µL de soro e 50µL do antígeno, mantidos a temperatura ambiente (21 a 25°C) por cerca de 10 minutos. A mistura soro/antígeno foi homogeneizada por cerca de 5 segundos com auxílio de ponteira em movimentos circulares de aproximadamente 2 cm de diâmetro. Movimentos de rotação suaves foram realizados com a placa para facilitar a leitura da prova. Após um a dois minutos foi realizada leitura observando a formação ou não de grumos característico. A ave foi considerada reagente perante a formação de grumos e não reagente quando a reação permanecia uniforme e transparente, sem grumos, durante 2 minutos.

4.11. Teste de inibição da hemaglutinação (IH) para o vírus da doença de Newcastle

O teste de IH foi realizado de acordo com o PNSA (Brasil, 2002). Para o teste de IH, a estirpe B1-Hichner do APMV-1 inativada (Biovet®) foi utilizada como antígeno após reconstituição em 30 mL de PBS (tampão fosfato-salina). Foram utilizadas microplacas (fundo em “u”) de 96 orifícios e hemácias frescas de galinhas adultas saudáveis (SPF), coletadas com seringas estéreis contendo anticoagulante citrato de sódio a 4% e lavadas três vezes em PBS (pH 7,2). A suspensão viral utilizada na técnica de IH foi titulada pelo teste da hemaglutinação (HA) imediatamente antes da execução da prova e calculada a diluição que continha quatro unidades

hemaglutinantes (UHA). Os soros testados foram diluídos previamente em PBS em volumes de 50µL em placas de 96 orifícios nas diluições de 1:8 a 1:16384. A suspensão do vírus (50µL) contendo 4UHA foi adicionada a cada diluição do soro. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente (25°C), foram adicionados 50 µL de uma suspensão de hemácias a 0,5%. Em cada prova foram utilizados soros controles positivo e negativo e a retrotitulação do antígeno para a confirmação de 4UHA. A placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente (25°C) e o título foi expresso como a recíproca da maior diluição que inibiu completamente a hemaglutinação, com a formação de botão de hemácias. O soro foi considerado não reagente onde não houve a formação de botão e ocorreu a hemaglutinação. A retrotitulação do antígeno demonstrou aglutinação completa em 4, 2 e 1 unidades e formação de botão a partir de 0,5 unidade hemaglutinante e menos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Malária aviária

Do total de 143 aves avaliadas quanto à presença de hemosporídeos, 58 foram positivas à PCR (Figura 2), perfazendo uma ocorrência geral de 40,5%. Na análise por espécie, o *Ramphastos toco* foi a de maior ocorrência (48,3%; n=87), seguido pelo *R. vitellinus* (44%; n=9) e *R. dicolors* (34,7%; n=23). Dos nove *R. tucanus* avaliados, nenhum apresentou parasitismo. Dos arazaris, quatro foram positivos (26,7%; n=15), acometendo *Pteroglossus aracari*, *P. bitorquatus*, *P. bailloni* e *Selenidera maculirostris* (Figura 3). Entre os *R. toco*, foram incluídas nove amostras de extração de DNA a partir de baços de animais necropsiados, sendo que quatro (44,4%) foram positivas.

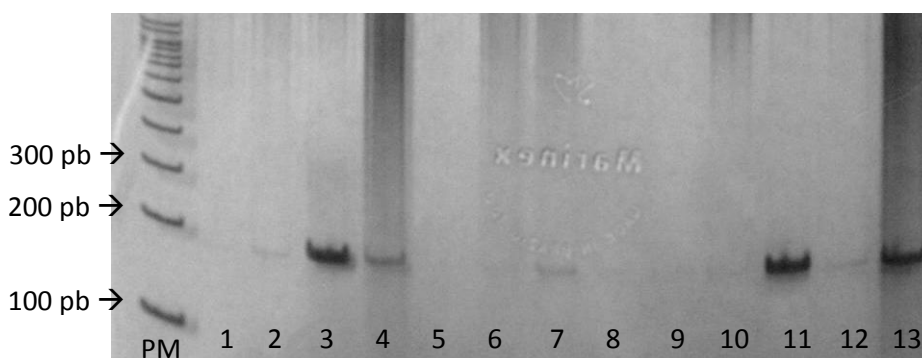


Figura 2: Gel de Poliacrilamida a 6% evidenciando a amplificação de 198 pb do gene SSU de *Plasmodium/Haemoproteus* pela técnica de PCR.

PM = Padrão de peso molecular

1 = Controle negativo

2, 3, 4, 7, 11, 12 = Amostras positivas de ranfastídeos

5, 6, 8, 9, 10 = Amostras negativas de ranfastídeos

13 = Controle positivo (*P. gallinaceum*)

Apesar de existirem dados sobre frequência de parasitismo por hemosporídeos em aves brasileiras (Ribeiro *et al.*, 2005; Belo *et al.*, 2009; Belo *et al.*, 2011) e em aves de

cativeiro (Schrenzel *et al.*, 2003), a metodologia utilizada para o diagnóstico foi diferente entre todos os trabalhos, o que impossibilita uma comparação criteriosa.

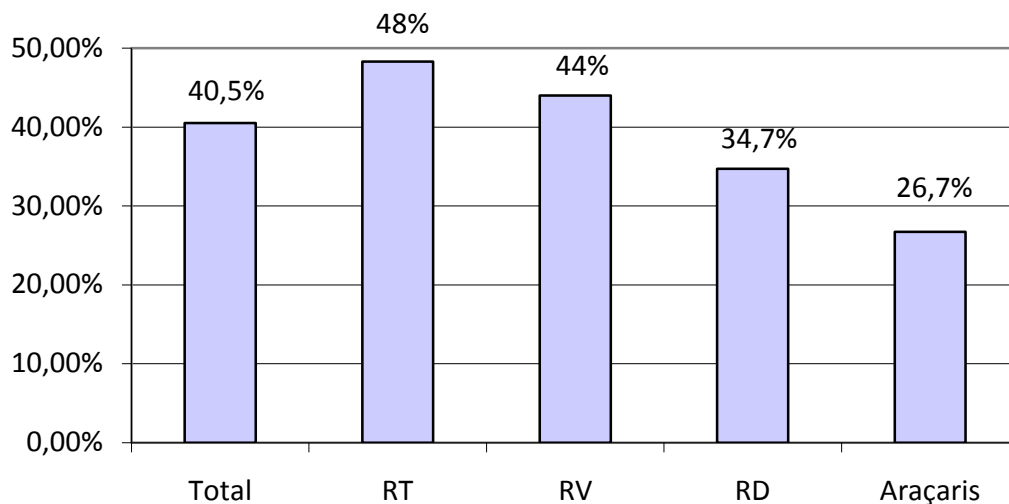


Figura 3: Distribuição percentual das aves positivas à PCR para *Plasmodium/ Haemoproteus*. RT = *Ramphastos toco*; RV = *R. vitellinus*; RD = *R. dicolorus*.

Hemoparasitos foram detectados em 52 dos 58 (89,6%) esfregaços avaliados e apenas formas evolutivas de *Plasmodium* spp. foram encontradas (trofozoítos e merontes). Adicionalmente, o sequenciamento de 20 amostras revelou apenas linhagens de *Plasmodium* spp. nos animais pesquisados. Hemosporídeos do gênero *Haemoproteus* já foram relatados em aves brasileiras (Belo *et al.*, 2011), no entanto ainda não foram registrados em membros da família Ramphastidae (Valkiunas, 2005).

A parasitemia foi baixa na maioria dos animais (3-10 parasitos/ 100 campos microscópicos). As formas mais frequentemente visualizadas foram trofozoítos jovens. Raros merontes foram observados em eritrócitos (Figura 4), e gametócitos não foram detectados, evidenciando que os animais apresentavam-se em fase crônica da infecção.

Consequentemente, a ausência de diferentes formas eritrocíticas em grandes quantidades impossibilitou a classificação das espécies de *Plasmodium* spp. pela avaliação morfológica.

Microfilárias foram encontradas em três esfregaços sanguíneos de *R. toco*, *R. dicolorus* e *R. vitellinus* (Figura 5). Esses dois últimos eram mantidos no mesmo criatório e a morfologia das microfilárias eram semelhantes. No tucano toco, apenas um exemplar foi encontrado nas duas lâminas avaliadas desse indivíduo, demonstrando um baixo parasitismo. O único relato de microfilária em ranfastídeos foi em tucano de Swainson (*Ramphastos swainsonii*), que não é pertencente à fauna brasileira (Manwell e Sessler, 1971).

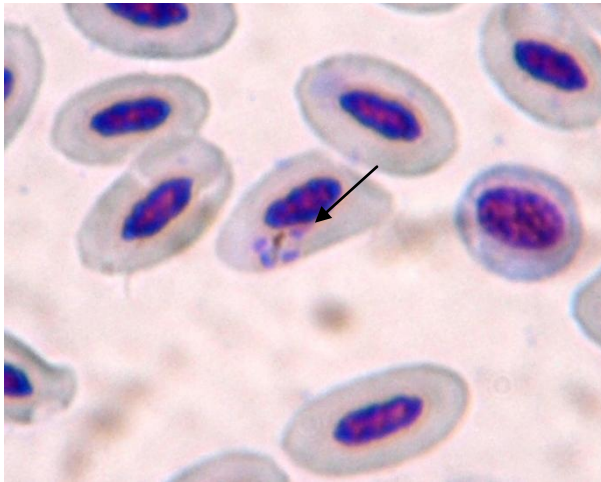


Figura 4: Meronte de *Plasmodium* sp., contendo quatro merozoítos, encontrado em eritrócito de *Ramphastos toco* (1000X). Coloração por Giemsa.

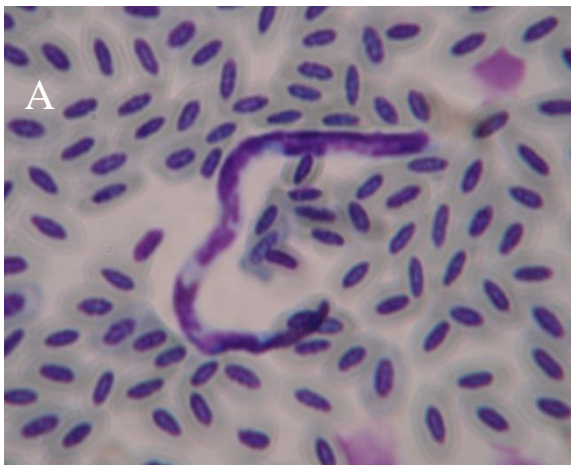
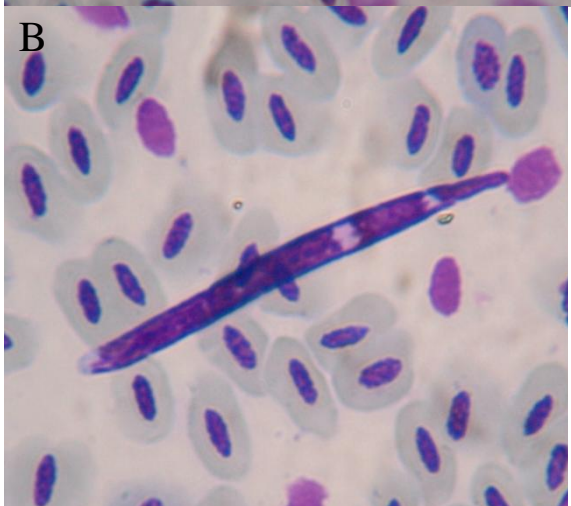


Figura 5: Microfilárias evidenciadas em esfregaços sanguíneos de *R. toco* (A) e de *R. vitellinus* (B) (1000X). Coloração por Giemsa.



Amplificação de parte do gene *cyt-b* (Figura 6) e posterior sequenciamento genético foram realizados em amostras de

20 aves. Doze foram provenientes de *R. toco*, cinco de *R. dicolorus* e três de *R. vitellinus*.

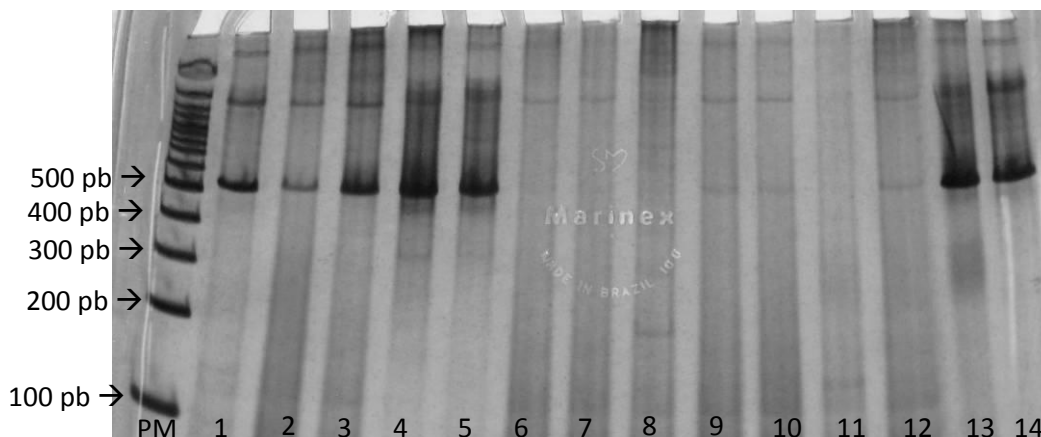


Figura 6: Gel de Poliacrilamida 6% evidenciando a amplificação de 515 pb do gene mitocondrial *cyt-b* de *Plasmodium/Haemoproteus* pela técnica de PCR.

PM = Padrão de peso molecular

2, 3, 4, 5, 13, 14 = Amplificações fortes o suficiente para a purificação e posterior sequenciamento genético.

9, 10, 12 = Amplificações fracas, que eventualmente foram sequenciadas.

6, 7, 8, 11 = Ausência de amplificação.

1 = Controle positivo (*P. gallinaceum*)

Foram identificadas cinco linhagens diferentes (figura 7), sendo que duas não haviam sido descritas na literatura (RATOC01 e RAVIT01). A primeira foi encontrada em *Ramphastos toco* mantido em uma clínica veterinária, na cidade de Belo Horizonte. A linhagem RAVIT01 foi

detectada em dois *Ramphastos vitellinus* mantidos em um criatório na cidade de Poços de Caldas, sul do estado. Infelizmente não se sabe a origem desses animais e há quanto tempo estavam em cativeiro.

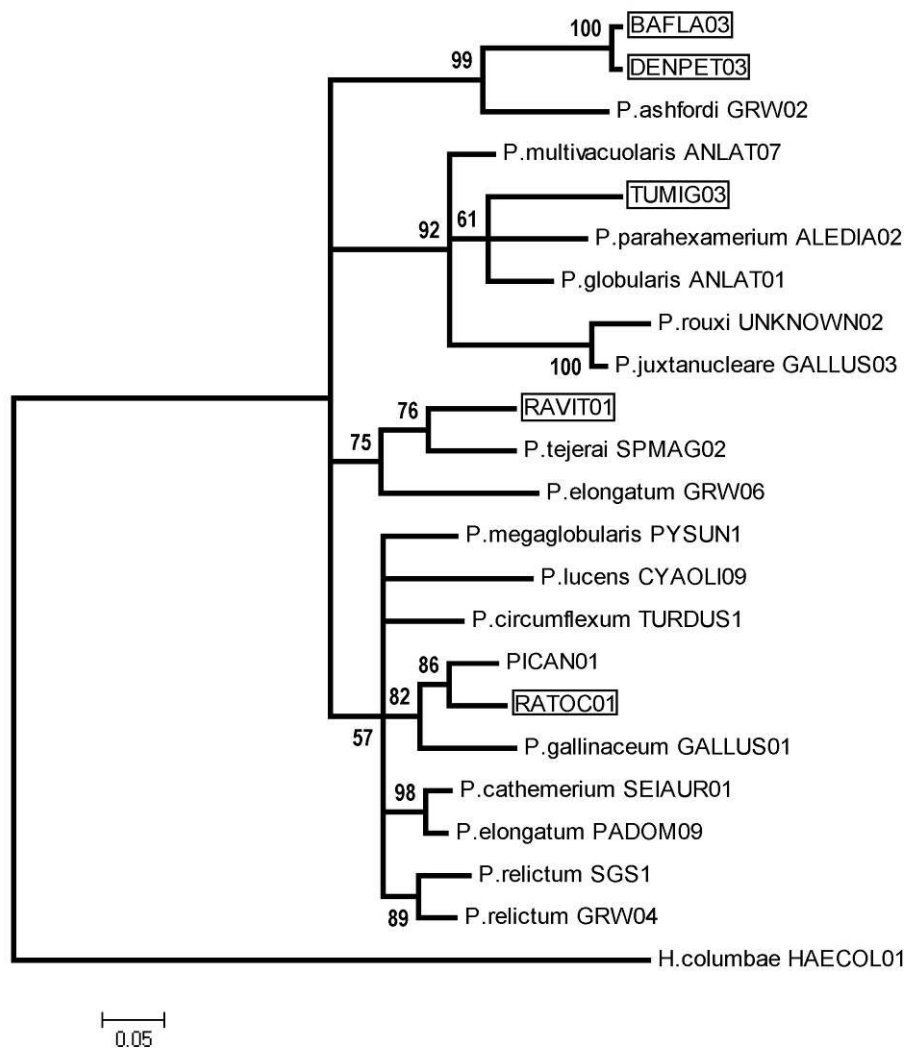


Figura 7: Árvore filogenética de *Plasmodium* spp. isolados de ranfastídeos em cativeiro no estado de Minas Gerais. Linhagens dentro de retângulos foram identificadas no presente estudo. Nota: BAFLA03 encontrada em três tucanos toco em Belo Horizonte; DENPET03 encontrada em cinco tucanos toco em Belo Horizonte e em um na cidade de Juatuba, em dois tucanos do bico verde em Betim e em Nova Lima e em um em Poços de Caldas e em um do bico preto nesta cidade; TUMIG03 encontrada em dois tucanos toco em Belo Horizonte; RAVIT01 encontrada em dois tucanos do bico preto em Poços de Caldas e RATOC01 encontrada em um tucano toco em Belo Horizonte.

A linhagem DENPET03 foi encontrada em 12 aves (seis tucanos toco, cinco tucanos do bico verde e em um do bico preto). Os animais parasitados se distribuíam em seis localidades nas cidades de Belo Horizonte,

Betim, Juatuba, Nova Lima e Poços de Caldas. Essa linhagem foi previamente encontrada na América do Norte (Ricklefs e Fallon 2002; Szymanski e Lovette 2005;

Pagenkopp *et al.*, 2008), na Guiana e Uruguai (Durrant *et al.*, 2006), e no Brasil (Marzal *et al.*, 2011). Os hospedeiros incluem animais de cinco famílias de Passeriformes e uma espécie de Psittaciforme. Em Minas Gerais essa linhagem foi encontrada em sete famílias de Passeriformes, em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, o que eleva a amplitude de hospedeiros para 10 famílias de pássaros (Lacorte *et al.*, 2012). Com o levantamento do presente trabalho, esta linhagem apresenta dispersão entre três ordens de aves, denotando um alto grau de generalismo. A linhagem TUMIG03 foi encontrada em dois tucanos toco, mantidos na cidade de Belo Horizonte. Assim como a DENPET03, possui grande distribuição geográfica, havendo relatos nos EUA (Ricklefs e Fallon., 2002; Martinsen *et al.*, 2007 e 2008), Chile (Merino *et al.*, 2008) e Uruguai (Durrant *et al.*, 2006) sendo todas as aves acometidas pertencentes à família Turdidae. Em Minas Gerais, essa linhagem foi encontrada em seis animais, sendo que todos também são da família Turdidae (Lacorte *et al.*, 2012).

A grande dispersão de linhagens de *Plasmodium* pode ser devida à combinação da distribuição dos vetores e a dispersão de animais parasitados, sendo que aves migratórias exercem um importante papel neste quadro (Waldenstrom *et al.* 2002; Pagenkopp *et al.*, 2008). Entretanto, embora os tucanos positivos sejam provenientes de captura em vida livre, eles poderiam ter sido infectados tanto no meio ambiente como nos criatórios. A grande dispersão da linhagem DENPET03 no estado de Minas Gerais e o parasitismo em três espécies do gênero *Ramphastos* concordam com a correlação positiva entre variedade de hospedeiros e prevalência (Durrant *et al.*, 2006; Hellgren *et al.*, 2009). No entanto, o fato de existirem linhagens de maior prevalência pode ser devido a diferentes habilidades dos vetores transmitirem algumas linhagens mais

eficientemente do que outras (Pagenkopp *et al.*, 2008).

A linhagem BAFLA03 foi encontrada em seis famílias de Passeriformes e na família Picidae, pertencente à ordem dos Piciformes, no levantamento realizado em Minas Gerais (Lacorte *et al.*, 2012). Esta linhagem foi a única identificada em picídeos, sendo que apenas três aves, em 17 pesquisadas, foram positivas. Juntamente com a linhagem DENPET03, são as de maior ocorrência no trabalho realizado por Lacorte *et al.*, 2012. Essas duas linhagens possuem diferença de dois pares de bases, o que leva à distância genética de 0,4% (Tabela 4). Segundo Bensch *et al.* (2004), parasitos que divergem em um par de base ou mais são entidades evolutivas distintas.

A linhagem RATOC01 apresentou 3,2% de diferença da PICAN01, que foi a única presente no banco de dados MalAvi obtida de ave da ordem dos Piciformes (pica pau da cabeça cinza - *Picus flavinucha*, no Myanmar; Ishtiaq *et al.*, 2007).

Considerando que morfoespécies diferentes apresentaram diferença genética mínima de 1,3% (*P. elongatum* e *P. cathemerium*), é possível afirmar que pelo menos quatro morfoespécies diferentes parasitam os ranfastídeos. As linhagens BAFLA03 e DENPET03 poderiam ser consideradas como espécie única e a segunda menor diferença genética entre as linhagens encontradas foi de 6,4% (RATOC01 e RAVIT01), valor maior do que grande parte das diferenças genéticas mínimas entre as morfoespécies diferentes. Com este critério, uma, duas e três morfoespécies de *Plasmodium* sp. teriam sido encontradas em *R. dicolorus*, *R. vitellinus* e *R. toco*, respectivamente.

De vinte e três indivíduos da espécie *R. dicolorus* amostrados para PCR, oito foram

positivos, sendo realizado o sequenciamento genético de cinco amostras. Das outras duas espécies de tucanos acometidas, em tucano toco foram encontradas quatro linhagens diferentes de *Plasmodium*. Duas linhagens foram detectadas em *R. vitellinus* (DENPET03 e RAVIT01), sendo que de nove indivíduos amostrados, quatro foram positivos e esta espécie de tucano foi amostrada em apenas um criatório. Tucanos do bico verde foram parasitados apenas pela linhagem DENPET03 sendo que foram provenientes de três locais, inclusive do criatório onde a linhagem RAVIT01 foi encontrada. Para elucidar se esta espécie seria resistente a outras linhagens de *Plasmodium*, mais animais deveriam ser pesquisados, em diversas localidades.

A avaliação quanto à presença de *Plasmodium* spp. em glândulas salivares de vetores que fazem repasto sanguíneo nessas aves, seria útil para avaliar o risco de infecção por diferentes linhagens (Ejiri *et al.*, 2011). Dos nove *R. tucanus* avaliados, nenhum foi positivo, sendo que seis animais eram mantidos em locais onde outras espécies de tucanos foram acometidos. A infecção experimental por *P. nucleophilum* foi realizada com sucesso nessa espécie (Manwell e Sessler, 1971), no entanto infecção natural ainda não foi relatada. Para avaliar a resistência a infecções naturais de hemossporídeos em *R. tucanus*, pesquisas com maior número de animais devem ser realizadas.

Mortalidade de tucanos toco foi relatada após a inoculação experimental de *P. huffi* (Muniz *et al.*, 1951) e morte por pericardite foi relacionada à infecção experimental por *P. nucleophilum* em um tucano do bico branco (Manwell e Sessler, 1971). Com a impossibilidade de caracterizar morfologicamente as espécies de *Plasmodium* no presente estudo e com a falta da caracterização molecular dessas morfoespécies descritas na literatura, não

foi possível esclarecer se essas espécies supracitadas, potencialmente patogênicas para ranfastídeos, foram encontradas no presente estudo.

O baixo sucesso reprodutivo de tucanos em cativeiro deve-se, principalmente, ao óbito dos filhotes por inanição, consequente da quantidade insuficiente de alimento fornecido pelos pais, ou por predação parental (Cziulik, 2010). Knowles e colaboradores (2010) concluíram que aves com infecções crônicas por *Plasmodium* spp. tem menor eficiência na eclodibilidade e na criação de filhotes, que é fortemente relacionado ao menor esforço parental no cuidado com as crias e, possivelmente, a alterações no comportamento termoregulatório ou incubatório dos pais. Outros fatores influenciam a reprodução de ranfastídeos em cativeiro, como estrutura física, pareamento dos casais e alimentação adequada (Jennings, 2001). No entanto, não se sabe sobre o efeito da malária aviária sobre a reprodução de aves em cativeiro. A ocorrência da malária em tucanos e araçarís e o histórico de insucesso na reprodução e manutenção destes animais cativos, sugerem que estudos sejam realizados para testar a influência de hemossporídeos no *fitness* parental dessas aves em cativeiro.

Dentre as aves pesquisadas, 38 foram provenientes de centros de triagem, sendo que 17 estavam parasitadas (44,7%). As aves recebidas por estes locais são prontamente destinadas a outras instituições ou para programas de reintrodução na natureza, fazendo com que haja o risco de que os parasitos possam ser introduzidos em locais previamente isentos.

A ocorrência de malária aviária nas populações estudadas, associada ao potencial de dispersão dos parasitos devido ao trânsito animal e a solturas no meio ambiente, justifica alterações no manejo dessas aves, visando o tratamento dos animais e controle de vetores.

Tabela 4: Distância genética entre linhagens e morfoespécies de *Plasmodium* spp.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	RAVIT01																					
2	TUMIG03	0,073																				
3	BAFLA03	0,073	0,073																			
4	DENPET03	0,073	0,073	0,004																		
5	RATOC01	0,064	0,082	0,075	0,070																	
6	<i>P.relictum</i> _GRW04	0,059	0,073	0,077	0,077	0,043																
7	<i>P.relictum</i> _SGS1	0,066	0,075	0,080	0,080	0,054	0,023															
8	<i>P.elongatum</i> _GRW06	0,057	0,080	0,073	0,073	0,057	0,052	0,068														
9	<i>P.elongatum</i> _PADOM09	0,052	0,068	0,080	0,080	0,050	0,030	0,037	0,054													
10	<i>P.gallinaceum</i>	0,057	0,087	0,087	0,082	0,041	0,050	0,061	0,066	0,041												
11	<i>P.juxtannucleare</i>	0,075	0,064	0,089	0,084	0,077	0,070	0,082	0,080	0,077	0,084											
12	<i>P.ashfordi</i>	0,084	0,080	0,059	0,059	0,087	0,070	0,082	0,070	0,075	0,089	0,096										
13	<i>P.cathemerium</i>	0,052	0,068	0,075	0,075	0,052	0,028	0,034	0,057	0,013	0,043	0,070	0,073									
14	<i>P.circumflexum</i>	0,061	0,066	0,066	0,066	0,045	0,037	0,043	0,057	0,041	0,048	0,075	0,068	0,032								
15	<i>P.globularis</i>	0,082	0,052	0,089	0,089	0,101	0,073	0,080	0,084	0,077	0,101	0,054	0,080	0,070	0,073							
16	<i>P.lucens</i>	0,066	0,084	0,084	0,084	0,073	0,050	0,059	0,070	0,054	0,066	0,075	0,087	0,052	0,059	0,080						
17	<i>P.megaglobularis</i>	0,061	0,082	0,070	0,070	0,052	0,039	0,037	0,068	0,034	0,057	0,084	0,080	0,034	0,045	0,087	0,059					
18	<i>P.multivacuolaris</i>	0,064	0,057	0,094	0,094	0,091	0,077	0,084	0,082	0,073	0,087	0,059	0,089	0,073	0,073	0,048	0,087	0,080				
19	<i>P.parahexamerium</i>	0,073	0,043	0,084	0,084	0,091	0,077	0,080	0,082	0,080	0,091	0,059	0,087	0,077	0,068	0,041	0,077	0,087	0,052			
20	<i>P.rouxi</i>	0,084	0,059	0,084	0,084	0,087	0,075	0,082	0,089	0,080	0,087	0,021	0,096	0,070	0,075	0,059	0,080	0,084	0,073	0,059		
21	<i>P.tejerai</i>	0,041	0,080	0,073	0,073	0,068	0,054	0,066	0,054	0,054	0,064	0,082	0,080	0,059	0,061	0,084	0,070	0,064	0,073	0,084	0,087	
22	PICAN01	0,052	0,080	0,068	0,064	0,032	0,041	0,048	0,061	0,048	0,039	0,080	0,087	0,045	0,043	0,094	0,061	0,054	0,089	0,084	0,080	0,061

5.2. Clostridioses

De um total de 128 *swabs* testados, houve isolamento de *Clostridium perfringens* em 11 amostras (8,5%). Em *R. toco*, nove animais albergavam o microrganismo, gerando a ocorrência de 12,2% (n=74). Ademais, isolou-se *C. perfringens* de *R. dicolorus* e *P. aracari*, sendo um isolamento por espécie. Animais positivos foram identificados em seis locais diferentes. Em quatro ocasiões, um animal positivo para *C. perfringens* era mantido com outro, do qual não houve isolamento da bactéria. Além disso, dois tucanos *toco* positivos estavam abrigados no mesmo recinto com outros três negativos e o *P. aracari* era mantido com três araçarís, também testados negativos. Com isso, pode-se especular que a carga do microrganismo pode não ser suficiente para contaminar todas as aves co-habitantes, ou que as aves eliminam *C. perfringens* intermitentemente, sendo portadoras, mas não detectadas na amostragem. Além disso, o teste através de *swabs* pode não apresentar sensibilidade suficiente para detectar todos os animais eliminando a bactéria.

Os 11 isolados foram classificados como *C. perfringens* tipo A, sendo que o gene codificador da toxina beta-2 (*cpb2*) foi detectado em três isolados encontradas em *R. toco* (27,3%). Os demais genes pesquisados na PCR multiplex (*cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*) não foram amplificados, assim como não houve detecção do gene *netB* nos 11 isolados pesquisados na PCR realizada separadamente.

C. perfringens tipo A é o mais comumente isolado em aves domésticas (Gomes *et al.*, 2008; Van Immerseel *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2007) e o único tipo isolado em episódios de enterite necrótica em aves silvestres (McOrist e Reece, 1992; Asaoka *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2007; Hagen e Bildfell, 2007). A frequência de isolamento

de *C. perfringens* em tucanos e araçarís foi baixa, se comparada com a de galinhas saudáveis, que foi de 68,4% (Gomes *et al.*, 2008). A alimentação destes animais era constituída de mistura de frutas e ração comercial sem antibióticos ou anticoccídios, o que diminui a possibilidade do efeito de fármacos no isolamento dos clostrídios. Membros da família Ramphastidae não possuem ceco (Sick, 1997) e o fato de que aves com este órgão residual ou ausente raramente albergam *Clostridium* no trato gastrointestinal (Gerlach, 1994) pode justificar estes resultados. Apesar de não haver trabalhos avaliando a presença deste microrganismo em aves silvestres aparentemente saudáveis, o presente estudo sugere que *C. perfringens* não faz parte da microbiota normal de tucanos e araçarís de cativeiro. No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas para elucidar esta questão.

A amplificação do gene *cpb2* foi previamente constatada em cegonha branca (*Ciconia ciconia*) com quadro agudo de enterotoxemia (Boujon *et al.*, 2005) e em psitacídeos com lesões típicas de EN (Crespo *et al.*, 2007). No entanto, a importância da toxina beta-2 na patogenicidade da doença é obscura e a presença deste gene não possui alta correlação com o desenvolvimento da EN em galinhas de postura (Crespo *et al.*, 2007; Slavic *et al.*, 2011). Apesar dos estudos não serem conclusivos, a ocorrência do gene *cpb2* nas estirpes de ranfastídeos no presente estudo é relevante, tendo em vista que a patogenicidade dessa toxina precisa ser avaliada em aves domésticas e silvestres.

O gene codificante da toxina NetB possui alta correlação com EN em galinhas poedeiras (Keyburn *et al.*, 2008) e é raramente encontrado em amostras de aves clinicamente saudáveis (Keyburn *et al.*, 2010). Sendo assim, a não amplificação do

gene *netB* no presente estudo não é surpreendente, uma vez que apenas animais clinicamente saudáveis foram amostrados. Esta é a primeira pesquisa pelo gene *netB* em estirpes de *C. perfringens* isoladas de aves silvestres. Devido à sua confirmada importância como marcador de virulência de estirpes causadoras de enterite necrótica em aves domésticas, enfatiza-se a necessidade de mais estudos para elucidar a real importância da toxina NetB para aves silvestres de cativeiro e de vida livre.

Ao teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), todos os isolados foram sensíveis à penicilina, vancomicina e metronidazol.

Três isolados foram resistentes à oxitetraciclina e à lincomicina (27,2%) e dois foram resistentes à eritromicina (18,2%) (Tabela 4). Susceptibilidade intermediária à oxitetraciclina e lincomicina foi detectada em quatro (36,7%) e em oito (72,7%) isolados, respectivamente. Dos *C. perfringens* isolados, seis (54,5%) foram resistentes a pelo menos um fármaco testado e dois tiveram resistência a dois antibióticos. Há poucos estudos avaliando a susceptibilidade antimicrobiana de *C. perfringens*, mesmo em aves domésticas. Além disso, não foram encontradas referências onde isolados de aves silvestres foram avaliados, dificultando comparações.

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM = mg/L) de *Clostridium perfringens* isolados de ranfástídeos de cativeiro em Minas Gerais.

Amostra	PEN	VANC	METRO	ERITRO	OXITETRA	LINCO
<u>RT01</u>	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	256,0 (R)	16,0 (R)	4,0 (I)
RT02	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	16,0 (R)	4,0 (I)
RT03	0,25 (S)	1,0 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	2,0 (S)	4,0 (I)
RT04	0,25 (S)	1,0 (S)	0,5 (S)	256,0 (R)	8,0 (I)	16 (R)
RT05	0,25 (S)	1,0 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	16,0 (R)	4,0 (I)
RT06	0,25 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	2,0 (S)	128,0 (R)
RT07	0,25 (S)	16,0 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	2,0 (S)	4,0 (I)
<u>RT08</u>	0,25 (S)	1,0 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	2,0 (S)	4,0 (I)
<u>RT09</u>	0,25 (S)	1,0 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	8,0 (I)	4,0 (I)
RD01	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	8,0 (I)	16 (R)
PA01	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	8,0 (I)	4,0 (I)

RT = *Ramphastos toco*, RD = *R. dicolorus*, PA = *Pteroglossus aracari*.

PEN = Penicilina, VANC = Vancomicina, METRO = Metronidazol, ERITRO = Eritromicina, OXITET = Oxitetraciclina, LINCO = Lincomicina. S = Sensível, I = Intermediário, R = Resistente.

Amostras sublinhadas foram positivas para o gene *cpb2*.

A alta sensibilidade de todos os isolados de *C. perfringens* à penicilina foi relatada em aves domésticas (Watkins *et al.*, 1997; Chalmers *et al.*, 2008). Apesar de haver relatos do aumento da resistência à penicilina em isolados de suínos e bovinos (Sazaki *et al.*, 2001; Slavic *et al.*, 2011), a concentração mínima testada (0,25mg/L) de penicilina, inibiu o crescimento de todos os isolados no presente estudo. Resistência ao metronidazol é pouco relatada, sendo que em um estudo de 275 isolados oriundos de bovinos, suínos, galinhas (n=100) e perus (n=50), apenas uma amostra de galinha foi resistente (Slavic *et al.*, 2011). Ao avaliar isolados de *C. perfringens* de galinhas, Slavic *et al.* (2011) encontraram apenas dois resistentes à eritromicina em um total de 100 isolados (2%). O presente estudo encontrou o mesmo número de amostras resistentes em um número amostral muito menor (2/11 = 18%). Em ambos trabalhos foi possível perceber uma distribuição bimodal, ou seja, parte das amostras foram inibidas com uma baixa concentração de eritromicina enquanto outro grupo foi inibido apenas com altas concentrações. No presente trabalho, nove isolados foram inibidos na concentração de 0,5mg/L e os dois resistentes só foram inibidos com a concentração de 256mg/L. Esse tipo de distribuição sugere um mecanismo genético de resistência, que possivelmente se deve à presença do gene *ermQ*, que codifica uma metilase resistente à eritromicina. Apesar de ter sido detectado em isolados de espécies domésticas (Slavic *et al.*, 2011), esse gene nunca foi demonstrado em *C. perfringens* presentes no trato gastrointestinal (TGI) de aves silvestres.

No presente trabalho, um dos fármacos de menor efetividade foi a oxitetraciclina, sendo que apenas quatro isolados foram satisfatoriamente sensíveis. Estudos tem demonstrado a presença de genes determinantes de resistência à oxitetraciclinas em isolados de bovinos (Sazaki *et al.*, 2001) e de aves domésticas

(Martel *et al.*, 2004). Esses genes determinam a produção de uma proteína protetora ribossomal contra a ação das tetraciclinas (Chopra e Roberts, 2001) e pode estar presente nas amostras isoladas de ranfastídeos.

Resistência à lincomicina foi relatada por Watkins *et al.* (1997), sendo que nenhum isolado foi sensível e grande parte dos isolados foi refratário a esse fármaco (CIM \geq 64mg/L). O presente estudo corrobora esses dados, pois três amostras foram resistentes e as oito restantes tiveram sensibilidade intermediária à lincomicina. Em outros trabalhos, foram encontrados isolados sensíveis a esse fármaco (Martel *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009), apesar de isolados resistentes também terem sido encontrados. O alto índice de resistência dos isolados de *C. perfringens* em tucanos e araçaris pode ser devido a um gene ainda não descrito (Martel *et al.*, 2004).

Genes determinantes de resistência de isolados de *C. perfringens* à eritromicina e à oxitetraciclina nunca foram detectados em amostras de aves silvestres. Com isso, seria de grande importância, localizar e caracterizar molecularmente esses genes, que provavelmente estão presentes nos isolados dos ranfastídeos pesquisados. A avaliação da presença de tais genes nos isolados obtidos poderá ser objeto de estudo futuro, uma vez que tais estirpes foram conservadas.

A avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de *C. perfringens* é útil para guiar o tratamento de doenças entéricas em aves silvestres. Com os dados aqui levantados, os antibióticos de escolha para o tratamento de enterites necróticas nessas aves seriam a penicilina, vancomicina ou o metronidazol. No entanto, sensibilidade *in vitro* não necessariamente indica o sucesso na terapêutica desses animais (Watkins *et al.*, 1997). Assim, a prescrição correta deve

ser avaliada em livros de referências terapêuticas disponíveis.

O presente trabalho aponta para a necessidade de novos estudos, visando esclarecer a comensalidade entre *C. perfringens* e aves silvestres. Além disso, como perspectiva, estudos futuros deverão ser conduzidos para avaliar a similaridade das amostras aqui isoladas com as encontradas na avicultura industrial ou de subsistência, para esclarecer a participação de aves silvestres na disseminação dessa bactéria entre animais domésticos.

5.3. Endoparasitos

Formas de endoparasitos foram detectadas em fezes de 38 aves em 123 avaliadas (31%), sendo que não foram detectadas infecções por mais de um tipo de parasito em uma mesma ave (Figura 8). Ovos típicos da família Trichuridae foram encontrados em 12 aves (9,7%) (Figura 9). Apenas animais do gênero *Ramphastos* foram acometidos (10,7%; n=112). As espécies mais parasitadas foram *R. dicolorus* (6/19; 31%) e *R. vitellinus* (3/9; 33%). Dois *R. toco*, dos 75 avaliados e um *R. tucanus* de nove pesquisados estavam parasitados. Larvas de helmintos não identificados foram encontradas em uma amostra de *R. toco* e em uma de *R. dicolorus*, no entanto, não foram detectados ovos de helmintos. Nenhum outro tipo de ovo foi encontrado as amostras avaliadas. No presente estudo, foi realizada apenas uma coleta de fezes por ave. Coletas seriadas, com amostragens em diferentes épocas do ano, possivelmente aumentariam o número de ranfastídeos positivos, devido ao aumento da sensibilidade com o maior número de testes realizados.

Animais parasitados por helmintos foram encontrados em apenas duas instituições. Em um zoológico, todos os animais avaliados foram positivos (dois *R. toco* e um *R. tucanus*). Há histórico de

mortalidade de tucanos devido à capilariose, que foi mencionada como a principal causa de óbito desses animais ao longo do tempo nessa instituição. No outro estabelecimento, seis dos 11 *R. dicolorus* e três dos nove *R. vitellinus* estavam parasitados por capilarídeos. Interessantemente, nenhum dos cinco *R. toco* ou dos 11 araçaris avaliados nessa mesma instituição estavam parasitados. Não foi possível estabelecer se os parasitos encontrados nesse plantel são específicos para as espécies de tucanos (do bico verde e do bico Preto), pois os animais são mantidos em viveiros separados e não se sabe se espécies positivas e negativas usaram os mesmos recintos. Essa promiscuidade viabilizaria a contaminação proveniente de larvas livres nos viveiros ou em hospedeiros paratênicos, que eventualmente poderiam ser ingeridos pelas aves. A perpetuação do parasitismo por capilarídeos no zoológico em questão poder ser devido aos pisos dos recintos que são de terra e grama, por existir vegetação onde os animais defecam e empoleiram e por poder haver hospedeiros paratênicos. Fezes escuras e de aspecto diarréico foram encontradas no recinto dos dois tucanos *toco*, endossando o fato de que o parasitismo por capilarídeos frequentemente causa danos à saúde de ranfastídeos de cativeiro (Cubas, 2006).

Apesar do grande número de aves avaliadas oriundas do CETAS/BH (n=37), em nenhuma foram identificados ovos de helmintos. Provavelmente esses animais, e os anteriores ao período desse estudo, não estavam parasitados à chegada e assim, não contaminaram o ambiente. Além disso, parte desses animais era mantida em gaiolas individuais, com o fundo gradeado de fácil limpeza e desinfecção, fazendo com que, caso animais positivos fossem abrigados, a higienização do ambiente e o vazio sanitário teriam sido eficientes para eliminar possíveis parasitos introduzidos no plantel.

Dentre os 123 animais avaliados quanto à presença de endoparasitos, oocistos de coccídeos foram encontrados em 24 aves (19,5%). Em *R. toco*, oocistos foram detectados em 20 das 75 amostras de fezes avaliadas (26,7%). Quatro dos nove *R. vitellinus* (44,4%) também estavam acometidos. Em nenhuma das demais espécies foram encontrados oocistos de coccídeos ou outros protozoários nas amostras de fezes. Todas as fezes contendo oocistos foram acondicionadas em dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) à temperatura ambiente para favorecer a esporulação. No entanto, apenas 12 amostras esporularam, sendo todas elas provenientes de *R. toco* (Figura 10). Apenas uma coleta foi realizada por indivíduo, o que pode ter resultado em falsos negativos, acarretando em uma possível subavaliação.

Parasitismo por *Eimeria forresteri* em tucanos toco foi relatada como patogênica, provocando diarreia severa em animais recém chegados aos EUA (Upton *et al.*, 1984). Por outro lado, Lainson *et al.* (1990) descrevem o parasitismo por *E. vitellini* em tucanos do bico preto, mantidos em um zoológico da cidade de Belém do Pará, como de baixa ou nenhuma patogenicidade. Apesar das espécies dos coccídeos

encontrados no presente estudo não terem sido identificadas, o impacto desses parasitos na saúde das aves não deve ser menosprezado. Diferentemente dos capilarídeos, animais parasitados por oocistos foram encontrados em cinco instituições diferentes, o que demonstra uma maior dispersão deste parasito em relação ao nematódeo. Das 24 aves parasitadas, sete foram provenientes do CETAS/BH. As aves deste local eram avaliadas poucos dias após a chegada, em um intervalo de tempo menor do que o tempo médio do ciclo médio das espécies de *Eimeria*, que é de 4-6 dias (McDougald, 2003). Com isso, os animais recebidos provavelmente já albergavam o parasito à chegada. A coccidíase pode ter maior importância para essas aves, que são submetidas a eventos estressantes, como transporte prolongado e mudanças bruscas no manejo alimentar e ambiência, o que pode ocasionar exacerbação do parasitismo, levando à doença clínica. A grande dispersão desse parasito denota a necessidade de realização de quarentena com realização de testes coproparasitológicos frequentes e periódicos, para impedir a introdução de coccídeos em plantéis isentos.

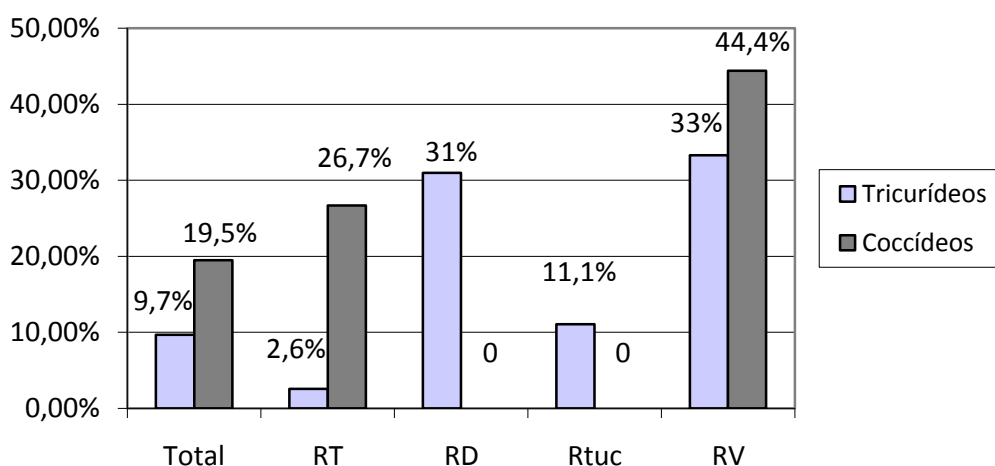


Figura 8: Distribuição percentual do endoparasitismo nas aves do presente estudo, de acordo com a forma do parasito encontrado nas fezes (Ovos de tricurídeos ou oocistos de coccídeos). RT = *Ramphastos toco*; RD = *R. dicolorus*; Rtuc = *R. tucanus*; RV = *R. vitellinus*.



Figura 9: Ovos de helmintos da família Trichuridae, encontrados em fezes de *Ramphastos tucanus*. Aumento de 400X.



Figura 10: Oocisto de *Eimeria* sp. encontrado em fezes de *Ramphastos toco*, esporulado em dicromato de potássio (Aumento de 400X).

Dos animais parasitados, dois também foram positivos ao isolamento de *C. perfringens* tipo A. Este microrganismo é o causador da enterite necrótica (EN) e, em galinhas, um dos principais fatores que predispõem ao desencadeamento da doença é a presença de *Eimeria* spp. no TGI (Van Immerseel *et al.*, 2004). Esta interação nunca foi descrita em animais silvestres e não se sabe se as coccidioses poderiam desencadear quadros de EN nessas aves. Um dos principais motivos do aumento da colonização de *C. perfringens* no TGI de animais com coccidiose é que proteínas plasmáticas, que são liberadas devido à lesão intestinal, forneçam meios propícios para a proliferação de tais bactérias (Van Immerseel *et al.*, 2004). Com isso, teoricamente, animais com capilarirose também tem o risco de desenvolver EN na presença da bactéria. No presente trabalho, *C. perfringens* foi isolado de dois animais

parasitados por capilarídeos. Assim, das 11 aves positivas para o isolamento desta bactéria, quatro (36%) possuíam parasitismo intestinal. Coleta de amostras de animais saudáveis pode dificultar a avaliação da patogenicidade da relação entre *C. perfringens* e endoparasitos, pois animais gravemente acometidos poderiam ter ido a óbito antes da realização do estudo. Como a infecção experimental não é factível por diversos fatores, animais apresentando enterites sanguinolentas ou necróticas devem ser avaliados quanto à presença da bactéria e de endoparasitos para avaliar os efeitos da interação desses patógenos.

A identificação de parasitos (ou ovos de parasitos) nem sempre implica em doença clínica. Mas o fato de se agrupar animais de diferentes localidades pode promover o contato de parasitos que podem ser

benignos para algumas aves e patogênicos para outras (Greiner e Ritchie, 1994). A superpopulação é um dos principais erros de manejo que favorecem o desenvolvimento de doença clínica decorrente de endoparasitos em aves (Yabsley, 2008), o que eventualmente ocorre em criatórios, zoológicos e centros de triagem. Assim, medidas de prevenção devem ser adotadas em qualquer instituição que abrigue ranfastídeos, tendo em vista a grande proporção de animais parasitados (31%), a patogenicidade desses parasitos (coccídeos e capilarídeos) e a dificuldade em eliminá-lo de planteis onde estes se estabelecem.

5.4. Ectoparasitos

Todas as 144 aves foram inspecionadas quanto à presença de ectoparasitos, o que revelou parasitismo em 29 animais (19,4%), sendo que em 16 tucanos eram piolhos (11%) e em 13 eram ácaros (9%) (Figura 11). Nove *R. toco* estavam parasitados por piolhos e nove (10,2%) parasitados por ácaros. Apenas um *R. dicolorus* foi encontrado com piolhos (4,3%) (Figura 12), enquanto três estavam parasitados por ácaros (13%). Um *R. tucanus* foi encontrado com ácaros (11%) (Figura 13) e seis *R. vitellinus* possuíam parasitismo por piolhos (66%) e não foram encontrados ectoparasitos nos araçaris avaliados.

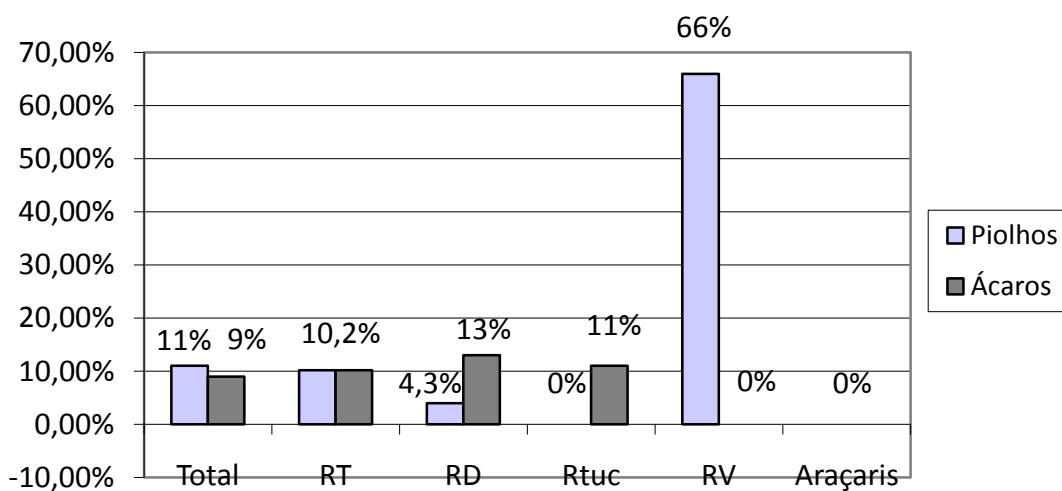


Figura 11: Distribuição percentual do ectoparasitismo nas aves avaliadas no presente estudo. RT = *Ramphastos toco*; RD = *R. dicolorus*; Rtuc = *R. tucanus*; RV = *R. vitellinus*.

Dos 11 criadouros e dois CETAS avaliados, ectoparasitos foram detectados em seis locais, incluindo o CETAS/BH. Em nenhum criadouro os dois tipos de parasitos foram encontrados, sendo que em apenas um foram encontrados ácaros e em quatro locais foram encontrados piolhos. No CETAS/BH foram recebidos dois animais parasitados por ácaros e um com piolhos. O método de catação manual não fornece dados quantitativos, para avaliar a carga parasitária, mas altas quantidades de piolhos foram encontradas em três tucanos, sendo que em um do bico Preto, o parasitismo aparentemente estava provocando falhas no empenamento.

A proporção de animais com ectoparasitos encontrada no presente estudo sugere que ranfastídeos em cativeiro devem ser inspecionados quanto à presença destes artrópodes. O parasitismo diminui a capacidade de isolamento térmico das aves, devido à perda da integridade da cobertura das penas. Isso provoca aumento da demanda metabólica e pode levar à perda de peso e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (Hoi *et al.*, 2012) e machos altamente parasitados podem ser menos atrativos para as fêmeas (Clayton *et al.*, 2007). No entanto, estes efeitos ainda não foram relatados em aves mantidas em cativeiro.

Lesões na articulação do tíbiotarso-metatarso foram encontradas em seis animais (quatro *R. toco*, um *R. dicolorus* e em um *R. vitellinus*) (Figura 14). Como tucanos realizam o *grooming*, por grande parte do tempo, com os pés, seria esperado que animais com este tipo de lesão apresentariam maiores cargas de ectoparasitos (Clayton e Cotgreave, 1994). Dos seis animais com essas lesões, apenas dois apresentaram grande infestação por ácaros e os animais com grandes quantidades de piolhos não apresentavam lesões nessa articulação. Todos os animais feridos apresentavam empoleiramento

normal e a lesão não parecia comprometer a mobilidade dos membros inferiores. Com isso, as lesões, aparentemente não dificultavam o *grooming* dos animais, o que, caso contrário, poderia favorecer o aumento da carga de ectoparasitos nos ranfastídeos. No presente trabalho, não foi possível estabelecer uma relação entre carga parasitária e lesão na articulação tíbiotarso-metatarso, no entanto seria de grande importância elucidar a interação destes dois fatos.

À parte disso, a própria lesão oferece risco à saúde de ranfastídeos em cativeiro, por poder evoluir para artrite ou osteomielite e septicemia (Cubas, 2001). Os ferimentos devem ser tratados e o manejo corrigido como medida preventiva. Foi observado, que em um criatório, os poleiros são demasiadamente calibrosos para os tucanos e arazaris, fazendo com que os animais se apoiem nas articulações. Com isso, é recomendada a adequação de acordo com a necessidade de cada espécie.



Figura 12: Parasitismo por piolhos em *R. dicolorus*.

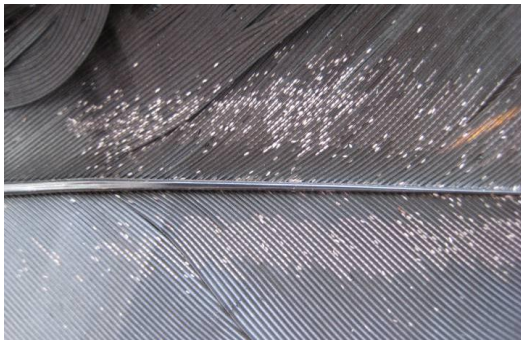


Figura 13: Parasitismo por ácaros plumícolas em *R. tucanus*.

A) Pena primária de com alta carga de ácaros.



B) Ácaros de *R. tucanus* visualizado à microscopia óptica em aumento de 400X.



Figura 14: Lesões nas articulações tíbiotarso-metatarso em *R. dicolorus*.

5.5. Clamidiose aviária

Na PCR para a detecção do DNA de *Chlamydomphila psittaci* realizada de 133 animais não houve positividade. No entanto, este resultado não descarta a possibilidade de infecção por *C. psittaci* em ranfastídeos mantidos em cativeiro em Minas Gerais. Um estudo com 25 ranfastídeos de cativeiro não detectou *C. psittaci* por PCR de *swabs* cloacais. No entanto, 16% dos animais foram positivos na sorologia pela reação de fixação do complemento (Raso *et al.*, 2005).

Algumas espécies de aves tornam-se portadoras do microrganismo, havendo liberação intermitente do agente. Em um estudo com duas coletas de *swabs* cloacais em psitacídeos, intercaladas de 48 horas, apenas 44% dos animais positivos tiveram concordância nas duas PCR realizadas (Raso *et al.*, 2002). Devido a questões logísticas, os tucanos e araquaris foram amostrados uma vez, fato que pode ter contribuído para a obtenção deste resultado. Padilla *et al.* (2003), após relatarem a negatividade de 50 albatrozes à PCR de *swab* cloacal, sugerem que *C. psittaci* ocorra em baixas prevalências ou não está presente nessas populações. O grande número de aves avaliadas no presente estudo corrobora as observações destes autores.

Das amostras pesquisadas, nove foram extraídas de baço de animais necropsiados e as 124 restantes foram obtidas a partir de *swabs* cloacais. Durante a fase crônica da infecção, *C. psittaci* pode ficar restrita a órgãos linfóides, sendo liberada pela ave intermitentemente (Beeckman e Vanrompay, 2010), o que pode ocasionar em falso-negativos ao avaliar *swabs* cloacais. Com isso, PCR a partir de amostras de baço seria mais sensível para diagnosticar animais na fase crônica da

doença, sugerindo que esses animais avaliados por amostras de baço (6%), pouco provavelmente eram portadores de *C. psittaci*.

Considerável número de tucanos toco avaliado foi oriundo de um centro de triagem (n=32). Essas populações são submetidas a condições que favorecem a primo infecção ou ativação de infecções latentes, como superpopulação e transporte prolongado (Raso *et al.*, 2004). Além disso, há casos de surto da doença em psitacídeos mantidos neste local (Ecco *et al.*, 2009), incluindo casos esporádicos de clamidiose durante o período de coleta de material do presente estudo (Vilela, 2012). Mesmo assim, os ranfastídeos avaliados não apresentavam sinais clínicos da doença, tampouco eliminavam a bactéria. Em estudo por PCR de *C. psittaci* em Cathartiformes, Falconiformes e Strigiformes recolhidas de vida livre e mantidas nesse centro de triagem, nenhuma ave foi encontrada positiva (Andery, 2011).

Apesar de todos os animais terem sido negativos para *C. psittaci*, não se pode afirmar que os ranfastídeos aqui estudados não eram portadores da bactéria. Com isso, estudos futuros, realizando mais de uma coleta de material biológico por animal e envolvendo avaliação sorológica, devem ser realizados para esclarecer a participação dessas aves no ciclo epidemiológico da clamidiose aviária.

5.6. Sorologia para *Salmonella Pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* e vírus da doença de Newcastle

Amostras de soro para a realização dos testes sorológicos foram obtidas de 103 aves, incluindo três amostras de araquaris (duas de *P. aracari*, e uma de *Selenidera maculirostris*). Nos testes de soroglutinação rápida em placa para SP e

MG e na IH para VDN, nenhum animal apresentou títulos detectáveis de anticorpos contra esses agentes. Os mesmos resultados foram encontrados no *R. toco* avaliado por Sousa (2007).

5.6.1. Salmonelose

Nenhum ranfastídeo estudado foi reagente à SAR. A pulorose é uma doença importante na avicultura e aparentemente não causa doença ou mortalidade com alta frequência em ranfastídeos. No entanto, sua relevância para a avifauna não pode ser subestimada. Araras soropositivas para SP apresentaram maior hematócrito e cloreto sérico, em comparação com aves negativas, que pôde ser interpretado como desidratação. A ocorrência de sorologia positiva em psitacídeos do gênero *Ara* foi de 28% (Karesh *et al.*, 1997). Deem *et al* (2005) encontraram alta taxa de reatividade (67%) à SP em psitacídeos de vida livre e de cativeiro. Animais cativos tiveram maior sororeatividade, o que pode ter sido devido ao contato das aves com humanos, galinhas de produção e outros animais. Prevalências menores foram encontradas em petréis de vida livre da Patagônia (37%) (Uhart *et al.*, 2003), em pombos silvestres do México (26,3%) (Espinosa-Arguelles *et al*, 2010) e em pinguins de Humboldt (7%) de vida livre no Peru (Smith *et al.*, 2008).

A produção de anticorpos aglutinantes tem início rápido em galinhas, dentro de 3-10 dias (Shivaprasad, 2003), fazendo do teste de SAR sensível e eficiente na detecção precoce da infecção. Apesar deste teste não ter sido validado para tucanos e araçaris e apenas resultados negativos terem ocorrido neste trabalho, a reatividade de diferentes espécies silvestres habilita a aplicação da SAR para ranfastídeos, gerando resultados confiáveis.

A sororeatividade cruzada da SAR para SP com outros sorotipos é inconsistente, mas pode ocorrer principalmente com o sorotipo

Gallinarum (Shivaprasad, 2003). Com isso não se exclui a possibilidade dos ranfastídeos analisados serem portadores de *Salmonella*, o que foi relatado por Gopee *et al.* (2000). Assim, cultivos bacteriológicos visando à seleção deste microrganismo, a partir de fezes, devem ser conduzidos no intuito de caracterizar a importância da *Salmonella* em ranfastídeos de cativeiro.

5.6.2. Micoplasmose

Nenhum ranfastídeo estudado foi reagente para MG por SAR. O teste de Soroaglutinação rápida para micoplasmose é de baixo custo e sensível, fazendo-o ser amplamente utilizado como diagnóstico inicial (Ley, 2003). Perus infectados experimentalmente mantiveram títulos de anticorpos detectados por este teste por mais de 18 meses, quando os experimentos foram interrompidos (Rocke *et al.*, 1988). Apesar das limitações em detectar todos os indivíduos infectados, o teste de SAR identificou todas as populações expostas, onde MG estava em circulação (Fritz *et al.*, 1992). Devido à sensibilidade e ao longo tempo de detecção de anticorpos contra MG do teste realizado, sugere-se que a doença provocada por este agente não parece ser de importância na manutenção de ranfastídeos em cativeiro.

Aves cronicamente infectadas ou infectadas por estirpes de baixa virulência podem apresentar títulos de anticorpos baixos ou não detectáveis (Luttrell e Fischer, 2007), fazendo com que a circulação desta ou de outras espécies de *Mycoplasma* não esteja descartada em tucanos e araçaris cativos. Falsa positividade tem sido documentada à SAR envolvendo aves silvestres, incluindo Passeriformes e Psittaciformes (Farmer *et al.*, 2005), sendo este um dos principais limitantes do teste.

Considerando a diversidade de espécies de Passeriformes susceptíveis ao MG e por aves deste grupo serem presas de

ranfastídeos de vida livre, não é improvável que estes animais tenham contato com essa ou outras espécies de *Mycoplasma*. Para avaliar a presença de *Mycoplasma* spp. em tucanos e araçarís, pesquisas com a aplicação de PCR para o gênero do agente, assim como testes sorológicos devem ser conduzidas em animais de vida livre e de cativeiro.

5.6.3. Doença de Newcastle

Nenhum ranfastídeo estudado apresentou títulos de anticorpos para VDN (APMV-1) ao teste de IH. Aves exóticas, incluindo ranfastídeos tiveram importância em um surto de doença de Newcastle nos EUA, por poderem ter sido a fonte do vírus que iniciou todo o quadro da doença na Califórnia (Pearson e McCann, 1975). De um total de 3780 aves exóticas, vírus velogênico foi isolado de 38 animais, sendo que três eram tucanos e araçarís, em 57 avaliados (5,26%). A prevalência do isolamento do vírus poderia ter sido maior, pois amostras foram avaliadas em *pools* de até 10 animais. Pearson e McCann (1975) realizaram o teste de IH em 231 aves e apenas nove foram consideradas positivas. O teste foi realizado em todas as espécies exóticas acometidas, no entanto, faisões foram os únicos animais positivos à IH, mas não positivos para o isolamento do vírus. Vinte ranfastídeos foram testados sorologicamente e todos foram negativos. Não foram fornecidos dados sobre os aspectos clínicos dos animais acometidos.

A detecção de anticorpos para APMV-1 na técnica de IH inicia-se entre seis e dez dias em aves sobreviventes à infecção e o tempo de duração da detecção varia de acordo com a estirpe, durando até um ano em exposição à vírus mesogênicos (Alexander, 2003). Foi relatada discrepância entre resultados de IH e detecção viral em aves silvestres (Lindh *et al.*, 2008). Por isso, resultados negativos devem ser interpretados com cautela por

este teste ter sido validado para a avicultura (especialmente *Gallus gallus domesticus*), sendo que a metodologia, sensibilidade e especificidade devem ser consideradas antes de se fazer conclusões e generalizações sobre o estado sanitário de populações de aves silvestres (Padilla *et al.*, 2003). Além disso, estirpes avirulentas foram capazes de incitar respostas imunológicas detectáveis à IH (Zanetti *et al.*, 2005), demonstrando que resultados positivos também devem ser bem interpretados.

Apesar da comprovada importância de aves aquáticas (Zanetti *et al.*, 2005) e de psitacídeos (Pearson e McCann, 1975) na epidemiologia da doença, alguns trabalhos encontraram apenas animais negativos no primeiro (Padilla *et al.*, 2003; Uhart *et al.*, 2003; Travis *et al.*, 2006ab) e no segundo grupo de aves (Gilardi *et al.*, 1995; Karesh *et al.*, 1997; Deem *et al.*, 2005, 2008; Stone *et al.*, 2005), apesar dos tamanhos amostrais consideráveis. Isso ilustra que apenas estudos pontuais não podem ser considerados para determinar a importância de determinados grupos de aves na epizootiologia da doença de Newcastle.

Estirpes velogênicas podem emergir a partir de estirpes lentogênicas circulantes entre aves silvestres (Gilchrist, 2005). Este fato denota a importância da vigilância epidemiológica em populações de aves não domésticas, como proposto pelo presente estudo.

Tendo em vista que tucanos e araçarís infectados com estirpes de alta patogenicidade podem não apresentar soroconversão (Pearson e McCann, 1975), e que o teste realizado (IH) no presente trabalho pode não detectar aves eliminando vírus lento ou mesogênicos (Lindh *et al.*, 2008), estudos futuros visando isolamento viral devem ser conduzidos para determinar

a importância dos ranfastídeos na dispersão do APMV-1.

5.7. Considerações finais

Dos 144 animais avaliados, 96 (66,6%) apresentaram pelo menos um dos quatro agentes etiológicos encontrados (*Plasmodium* spp., *Clostridium perfringens*, endoparasitos ou ectoparasitos) (Apêndice 1). No total, 65 (45,1%), 21 (14,6%) e 10 (7,0%) aves foram detectadas com um, dois e três agentes etiológicos, respectivamente. Infecções crônicas por *Plasmodium* spp. podem levar a imunossupressão das aves, favorecendo infecção por agentes oportunistas (Schrenzel *et al.*, 2003). No presente estudo, 22 aves portadoras de malária (15,2%) apresentaram outros agentes etiológicos, o que poderia provocar a exacerbação da proliferação desses patógenos, levando à doença clínica e possivelmente ao óbito ou aumentar a susceptibilidade a outras doenças. E apesar desses parasitismos, em alguns casos, serem relatados como de baixa ou nenhuma patogenicidade (Lainson *et al.*, 1990; Valkiunas, 2005; Clayton *et al.*, 2007), a concentração de indivíduos no cativeiro e o manejo sanitário incorreto podem favorecer o aumento da carga parasitária e o desenvolvimento de doença clínica. O número de animais coinfectados pode ser maior, pois a presença de endoparasitos e de *C. perfringens* não foi avaliada em 21 e em 11 aves, respectivamente. Estudos de vigilância epidemiológica em animais silvestres de cativeiro são importantes para determinar erros de manejo (Murphy *et al.*, 1993), e assim, pode-se determinar os entraves na manutenção e reprodução dessas espécies.

Durante as várias coletas de material biológico, tucanos de vida livre em contato próximo com os cativos foram observados em três locais. No entanto, há a possibilidade dessa interação ocorrer com grande frequência em vários locais, pois o

tempo gasto durante as visitas pode não ter sido suficiente para a observação de aves de vida livre no entorno dos estabelecimentos. Além disso, outras espécies de aves poderiam participar do ciclo epidemiológico dessas e de outras doenças. Este contato favorece a transmissão de agentes etiológicos nas duas vias, ou seja, animais de vida livre podem carrear patógenos para o cativeiro, assim como podem adquirir agentes etiológicos dos animais cativos. De acordo com os dados do presente estudo, este quadro poderia ocorrer no caso da malária, pois *Plasmodium* spp. foi detectado nesses três locais. Além disso, a linhagem DENPET03, que é altamente generalista, foi identificada em quatro aves em duas dessas instituições. A transmissão de *C. perfringens* só poderia ser possível caso animais de vida livre defecessem sobre o recinto dos tucanos cativos, o que seria factível. No entanto, não se sabe sobre a ocorrência desse microrganismo em aves de vida livre. É pouco provável que a transmissão de ectoparasitos entre animais livres e cativos ocorra, pois isso depende de contato direto, que geralmente ocorre entre casais ou pais e filhotes (Clayton *et al.*, 2007).

No presente estudo, quatro locais de coleta possuíam aves domésticas, incluindo galinhas, pavões, galinhas d'Angola e aves aquáticas, com trânsito livre nos criatórios. Isso levou ao total de 78 ranfastídeos (54%) expostos a potenciais portadores de *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. ou de Paramyxovirus aviários, demonstrando falhas na biossegurança na criação destas aves silvestres, embora os testados foram soronegativos para todos estes agentes. Estudo realizado em um dos criatórios onde ranfastídeos eram mantidos, revelou soropositividade de cracídeos à SP e ao VDN (Marques, 2010). Dejetos da produção animal e atividades da avicultura são importantes fontes de contaminação ambiental e tem importância na veiculação destes patógenos para animais de vida livre

e, possivelmente, em cativeiro (Uhart *et al.*, 2003; Butron e Brightsmith, 2010). Assim, medidas mínimas de biossegurança devem ser adotadas para diminuir o risco de transmissão desses patógenos para tucanos e araçarís, assim como para outras espécies de aves mantidas nesses locais.

O presente estudo fornece dados inéditos sobre agentes etiológicos em aves da família Ramphastidae. Não havia descrições moleculares de *Plasmodium* spp. que acometem membros dessa família. Adicionalmente, relatou-se hemoparasitismo nas espécies: *R. dicolorus*, *R. vitellinus*, *Selenidera maculirostris* e *Pteroglossus bailloni*. Isolamento, genotipificação e susceptibilidade antimicrobiana de *Clostridium perfringens* nunca tinham sido realizados em ranfastídeos. A presença de endo e ectoparasitos em ranfastídeos cativos é descrita na literatura, apesar disso, no presente trabalho preparou-se o primeiro levantamento epidemiológico destes parasitos em diferentes localidades onde essas aves são mantidas.

CONCLUSÕES

Foi detectada alta ocorrência de parasitismo por *Plasmodium* spp. em aves da família Ramphastidae mantidas em cativeiro no estado de Minas Gerais;

Pelo menos quatro espécies de *Plasmodium* sp. e cinco genótipos parasitam ranfastídeos, sendo a maior diversidade genética do parasito encontrada em *R. toco*, seguido pelo *R. vitellinus* e pelo *R. dicolorus*;

Clostridium perfringens tipo A foi isolado em dez tucanos e de um araçari, sendo que três foram positivos para o gene *cpb2*. Estes isolados apresentaram sensibilidade relativamente alta aos fármacos testados;

Foi encontrado alto índice de endoparasitismo, sendo os coccídeos mais presentes nas populações avaliadas do que os capilarídeos;

Foi encontrado parasitismo por piolhos e ácaros plumícolas em tucanos;

Chlamydophila psittaci não foi detectada por PCR nos ranfastídeos avaliados;

Não foram encontrados títulos detectáveis de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella Pullorum* e o vírus da doença de Newcastle nas aves avaliadas;

A destinação de tucanos para mantenedouros de fauna ou para a vida livre incorre em risco de introdução de *Plasmodium* spp., *Clostridium perfringens* e endo e ectoparasitos em ambientes previamente isentos;

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: SAIF, Y. M. *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State, 2003. p.63 –92.
- ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, p. 433-350, 2007.
- ALLGAYER, M. C.; GUEDES, N. M. R.; CHIMINAZZO, C. *et al.* Clinical pathology and parasitologic evaluation of free-living nestlings of the hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *J. Wildl. Dis.*, v. 45, n. 4, p. 972-981, 2009.
- AL-SHEIKHLY, F; AL-SAIEG, A. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chicken. *Avian Dis.*, v. 24, n. 2, p. 325-333, 1979.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L.; SANTANA, G. G. The role of animal-

- derived remedies as complementary medicine in Brazil. *BioScience.*, v.57, n. 11, p. 949-955, 2009.
- ANDERSEN, A. A.; FRANSON, J. C. Avian Chlamydiosis. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases in wild birds*. Iowa: Blackwell, 2007. p. 303-316.
- ANDERSEN, A.A.; VANROMPAY, D. Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAIF, Y.M. (Ed.) *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State, 2003. cap. 22, p. 719-721.
- ANDERY, D. A. *Perfil sanitário de rapinantes de cativo e recolhimento em um centro de triagem de animais silvestres, Belo Horizonte/MG*. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ARTOIS, M; MANVELL, R.; FROMONT, E. *et al.* Serosurvey for Newcastle disease and avian influenza A virus antibodies in great cormorants from France. *J. Wildl. Dis.*, v. 38, n. 1, 2002.
- ASAOKA, Y.; YANAI, T.; HIRAYAMA, H. *et al.* Fatal necrotic enteritis associated with *Clostridium perfringens* in wild crows (*Corvus macrorhynchos*). *Avian Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 19-24, 2004.
- ATKINSON, C.T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L. *et al.* Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.*, v. 36, n. 2, p. 197-204, 2000.
- ATINKSON, C. T. Avian Malaria. In: ATINKSON, C.T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Iowa: Wiley-Blackwell. 2008. p. 35-52.
- AZIPIRI, G. S.; MALDONADO, F.G.; GONZÁLEZ, G. C. La importancia del estudio de enfermedades em la conservación de fauna silvestre. *Vét Méx.*, v. 31, n. 3, p. 223-230, 2000.
- BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G. *et al.* Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* v. 100, p. 11-16, 2004.
- BEECKMAN, D. S. A.; VANROMPAY, D. C.G. Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydomphila psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet. Microbiol.*, v. 141, p. 342-353, 2010.
- BELO, N.O.; PASSOS, L.F.; JÚNIOR, L.M.C. *et al.* Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev. Vet. Med.*, v. 88, p. 220-224, 2009.
- BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T.; REIS, E. S. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct cerrado habitats in Brazil. *PLoS One.*, v. 6, n. 3, e17654, 2011.
- BENČINA, D.; DORRER, D.; TADINA, T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. *Avian Pathol.*, v. 16, p. 653-664, 1987.
- BENČINA, D.; TADINA, T.; DORRER, D. Natural infections of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathol.*, v. 17, p. 441-449, 1988.
- BENSCH, S.; PÉREZ -TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J. *et al.* Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasite: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution.* v. 58, n. 7, p. 1617-1621, 2004.

- BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ - TRIS, J. Malawi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Mol. Ecol.*, v. 9, p. 1353-1358, 2009.
- BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BOUJON, P.; HENZI, M.; PENSEYRES, J. H. *et al.* Enterotoxaemia involving β -toxicogenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*). *Vet. Rec.*, v. 156, p. 746-747, 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA Nº. 44, de 23 de agosto de 2001. Anexo Normas Técnicas para o Controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. meleagridis*). Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 68, 24 ago. 2001. Seção 1. 10 p.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA Nº. 32, de 13 de maio de 2002. Anexo Normas Técnicas de Vigilância para Doença de Newcastle e Influenza Aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 28, 14 mai. 2002. Seção 1. 14 p.
- BROUSSARD, C. T.; HOFACRE, C. L.; PAGE, R. K. *et al.* Necrotic Enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Dis.*, v. 30, n. 3, p. 617-619, 1986.
- BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food. Microbiol.*, v. 74, p. 195-202, 2002.
- BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T. *et al.* Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo zoo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 173, p. 123-127, 2010.
- BUTRON, O.; BRIGHTSMITH, D. J. Testing for *Salmonella* spp. in released parrots, wild parrots, and domestic fowl in lowland Peru. *J. Wildl. Dis.* v. 46, n. 3, p. 718-723, 2010.
- CATÃO-DIAS, J. L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. *Ciênc.e Cul.*, v. 55, n. 3, p. 32-34, 2003.
- CATÃO-DIAS, J. L. Biossegurança na manipulação de animais silvestres. *Ciênc. Vet. Trop.*, v. 11, n. 1, p.178-181. 2008.
- CBRO. 2011. Lista das aves do Brasil. 10ª edição (25 de maio de 2011). Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, Sociedade Brasileira de Ornitologia. Disponível em <http://www.cbro.org.br>. Acessada em 15/01/2012.
- CHALMERS, G.; MARTIN, S.W.; HUNTER, D.B. *et al.* Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet. Microb.*, v. 127, p. 116-127, 2008.
- CHIARELLO, A. G. Conservation value of a native forrest fragment in a region of extensive agriculture. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 60, n. 3, p. 237-247, 2000.
- CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F. X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg. Infec. Dis.*, v. 13, n. 1, p. 6-11, 2007.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 65, p. 232-260, 2001.

- CLAYTON, D. H.; COTGREAVE, P. Relationship of bill morphology to grooming behavior in birds. *Anim. Behav.*, v. 47, p. 195-201, 1994.
- CLAYTON, D. H.; MOYER, B. R.; BUSH, S. E. *et al.* Adaptive significance of avian beak morphology for ectoparasite control. *Proc. R. Soc. B.*, v. 272, p. 811-817, 2005.
- CLAYTON, D. H.; ADAMS, R. J.; BUSH, S. E. Phthiraptera, the Chewing Lice. In: ATINSON, C.T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. Iowa: Wiley-Blackwell. 2008. p. 463-497.
- Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Test. *Twenty-first Information Supplement*, v.31, n.1, p. 1-160, 2011.
- COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*, v. 15, p. 55-60, 2009.
- COTGREAVE, P.; CLAYTON, D. H. Comparative analysis of time spent grooming by birds in relation to parasite load. *Behaviour*, v. 131, n. 3-4, p. 171-187, 1994.
- CRAVEN, S. E.; STERN, N. A.; COX, N. A. *et al.* Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given Mucosal Starter Culture™. *Avian Dis.*, v. 43, p. 484-490, 1999.
- CRESPO, R.; FISHER, D. J.; SHIVAPRASAD, H. L. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 19, p. 329-333, 2007.
- CUBAS, Z. S. Medicine: family Ramphastidae (Toucans). In: FOWLER, M. E.; *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Iowa State University Press, p.186-188. 2001.
- CUBAS, Z. S. Piciformes (tucano, araçari, pica pau). In: Cubas Z.S., Silva J.C.R., Catão-Dias J.L. (Ed.), *Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca. 2006. p. 210-221.
- CZIULIK, M. *Cuidado parental de Selenidera maculirostris, Pteroglossus castanotis e Ramphastos toco (Piciformes – Ramphastidae), no interior de ninhos*. 2010. 120f. Tese (Doutorado em zoologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- DAOUST, P. Y. & PRESCOTT, J. F. Salmonellosis. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases in wild birds*. Iowa: Blackwell, 2007. p.270–288.
- DEEM, S. L.; NOSS, A. J.; CUÉLLAR, R. L. *et al.* Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 36, n. 4, p. 598-605, 2005.
- DEEM, S. L.; LADWIG, E. B. S.; CRAY, C. *et al.* Health Assessment of the *ex situ* Population of St Vincent Parrots (*Amazona guildingii*) in St Vincent and the Grenadines. *J. Avian. Med. Surg.*, v. 22, n. 2, p. 114-122, 2008.
- DA SILVA, S. O.; DE OLIVEIRA, H. H.; TEIXEIRA, R. H. F. Malófagos (Phthiraptera, Amblycera, Ischnocera) em aves cativas no sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Entomol.*, v. 53, n. 3, p. 495-497, 2009.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science.*, v. 287, p. 443-449, 2000.
- DICKX, V.; GEENS, T.; DESCHUYFFELEER, T. *et al.*

- Chlamydophila psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, n. 9, p. 3244–3250, 2010.
- DUARTE, V. V.; SINHORINI, J. A.; ALLEGRETTIET, L. *et al.* Identificação de *Mycoplasma* spp. em passeriformes mantidos em cativeiro na cidade de Itanhaém – São Paulo. In: Congresso da associação brasileira de médicos veterinários de animais selvagens, 10., 2006, São Pedro, SP; Encontro da associação brasileira de médicos veterinários de animais selvagens, 15., 2006, São Pedro, SP. *Anais do X Congresso e XV Encontro da ABRAVAS* São Pedro, SP, ABRAVAS, 2006. p. 71.
- DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F. *et al.* Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. *Ornithol. Monog.*, n. 60, p. 98-111, 2006.
- ECCO, R.; PREIS, I. S.; MARTINS, N. R. S. *et al.* An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 2, n. 2, p. 85-90, 2009.
- EJIRI, H.; SATO, Y.; KIM, K. S. *et al.* Entomological study on transmission of avian malaria parasites in a zoological garden in Japan: bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite DNA from blood-fed mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, v. 48, n. 3, 2011.
- ESPINOSA-ARGUELLES, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, N.I.; INFANTE-RODRÍGUEZ, F.; *et al.* Seroprevalence of antibodies against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum-Pullorum* in wild doves (*Zenaida asiatica* and *Zenaida macroura*) from the Northeast of Mexico. *Prevent. Vet. Med.*, v.93, p. 77–79. 2010.
- FARMER, K. L.; HILL, G. E.; ROBERTS, S. R. Susceptibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Wildl. Dis.*, v.41, n.2, p. 317-325, 2005.
- FALLON, S.M.; RICKLEFS, R.E.; SWANSON, B.L. *et al.* Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J. Parasitol.*, v.89, n.5, p. 1044–1047, 2003.
- FRIEND, M.; FRANSON, J. C. Field manual of wildlife diseases: general field procedures and disease of Birds, U.S. geological survey, biological resources division information and technology report. Virginia: Reston, 1999.
- FRITZ, B. A.; THOMAS, C. B.; YUILL, T. M. Serological and microbial survey of *Mycoplasma gallisepticum* in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) from six western states. *J. Wildl. Dis.*, v.28, p. 10–20, 1992.
- GALETTI, M.; LAPS, R.; PIZO, M.A. Frugivory by toucans (Ramphastidae) at two altitudes in the Atlantic Forest of Brazil. *Biotropica*, v. 32, n. 4b, p. 842-850, 2000
- GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *J. Parasitol.*, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.
- GARCÍA, C.; SORIANO, J. M.; BENÍTEZ, V. *et al.* Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poultry Sci.* v. 90, p. 1581–1585, 2011.
- GARNHAM, P.C.C. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publications.1966, 114p
- GARNHAM, P.C.C.; DOUGGAN, A.J. Catalogue of the Garnham collection of

malaria parasites and other Haemosporidia. 1986, 191p.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. *Avian medicine: Principles and application*. Boca Raton: Wingers. 1994. p. 1007-1029.

GILARDI, K. V. K.; LOWENSTINE, L. J.; GILARDI, J. D. *et al.* A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddelli*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. *J. Wildl. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 523-528, 1995.

GILCHRIST, P. Involvement of free-flying wild birds in the spread of the viruses of avian influenza, Newcastle disease and infectious bursal disease from poultry products to commercial poultry. *World's Poultry Sci. J.*, v. 61, p. 198-214, 2005.

GOMES, A. M.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. R. S. *et al.* Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. *Ciênc. Rural*, v.38, n.7, p. 1943-1947, 2008.

GOMES, A. M.; COSTA LL; VILELA D.A.R.; *et al.* Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Dead Captive Psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Braz. J.Poultry Sci.*, v.12, n.2, p. 101-104, 2010.

GOPEE, N. V., ADESIYUN, A. A., CAESAR, K. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *J. Wildl. Dis.*, v. 36, p.284-293, 2000.

GREINER, E. C.; RITCHIE, B. W. parasites. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. *Avian medicine: Principles and application*. Boca Raton: Wingers. 1994. p. 1007-1029.

GRIM, K. C.; DER MERWE, E. V.; SULLIVAN, B. A. M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

HAGEN, C. A. e BILDFELL, R. J. An Observation of *Clostridium perfringens* in Greater Sage-Grouse. *J. Wildl. Dis.*, v. 43, n. 3, p. 545-547, 2007.

HALL, A. J.; SAITO, E. K. Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004. *J. Wildl. Dis.*, v. 44, n. 3, p. 585-593, 2008.

HEEZIK, Y.; LEI, P.; MALONEY, R. *et al.* Captive breeding for reintroduction: influence of management practices and biological factors on survival of captive kaki (Black Stilt). *Zoo Biol.*, v. 24, p. 459-474, 2005.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* v.90, n.4, p. 797-802, 2004.

HELLGREN, O.; PÉREZ -TRIS, J.; BENSCH, S. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, v. 90, n. 10, p. 2840-2849, 2009.

HELMBOLDT, C. F.; BRYANT, E. S. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. *Avian Dis.*, p. 775-780, 1971.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J. *et al.* Prevalence of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin .Microbiol.*, v. 37, n. 2, p. 358-361, 1999.

- HORTA, R.S.; FERREIRA JUNIOR, F.C.; COSTA, M.P. *et al.* Malária aviária em tucanos (*Ramphastos toco*) oriundos de centros de triagem e criatórios em Minas Gerais. Congresso brasileiro de clínicos de veterinários de pequenos animais, 31., 2010, Belém. *Anais do 31º Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*. Belém, Pará. 2010.
- HOLBROOK, K. M. Home range and movement patterns of toucans: implications for seed dispersal. *Biotroica.*, v. 43, n.3, p. 357-364. 2011.
- HOI, H.; KRIŠTOFÍK, J.; DAROLOVÁ, A. *et al.* Experimental evidence for costs due to chewing lice in the European bee-eater (*Merops apiaster*). *Parasitology*, v. 139, p. 53-59, 2012.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. Mr Bayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-755, 2001.
- ISHTIAQ, F.; GERING, E., RAPPOLE, J. H. *et al.* Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. *J. Wildl. Dis.*, v. 43, n. 3, p. 382-398, 2007.
- JENNINGS, J. Captive management: family Ramphastidae (toucans). In: FOWLER, M. E. *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Iowa: State University Press, 2001. p.186-188.
- JENNINGS, J. Toucans and their captive reproduction. 2008. Disponível em <<http://www.emeraldforestbirds.com/AdditionalLiterature.htm>>. Acessado em: 17 de maio de 2010.
- KALETA, E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.*, v. 32, n. 5, p. 435-462, 2003.
- KARESH, W. B.; CAMPO, A.; BRASELTON, W. E. *et al.* Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 28, n. 4, p. 368-377, 1997.
- KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P. *et al.* NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS One.*, v. 4, n. 2, e26, 2008.
- KEYBURN, A. L.; YAN, X. X.; ANNAM, T. L. B. *et al.* Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet. Res.*, v. 41, n. 21, p. 1-8, 2010.
- KESSEL, A.S, GILLESPIE, I.A., O'BRIEN, S.J. *et al.* General outbreaks of infectious intestinal diseases linked with poultry, England and Wales, 1992 - 1999. *Commun. Dis. Publ. Health.*, n. 4, p. 171-177, 2001.
- KLEVEN, S. H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.). *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 719-721.
- KOBAYASHI, H.; KANAZAKI, M.; SHIMIZU, Y. *et al.* *Salmonella* isolates from cloacal swabs and footpads of wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *J. Vet. Med. Sci.* v. 69, n. 3, p. 309-11. 2007.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 5 ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.
- KNOWLES, S. C. L.; PALINAUSKAS, V.; SHELDON, B. C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *J. Evol. Biol.*, v. 23, p. 557-569, 2010.

- LAINSON, R.; COSTA, A. M.; SHAW, J. *Eimeria vitellini* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the brazilian toucan, *Rhamphastos vitellinus vitellinus* Lichtenstein (Aves: Piciformes: Rhamphastidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 85, n. 2, p. 199-202, 1990.
- LEIGHTON, F. A. & HECKERT R.A. Newcastle disease and related avian Paramyxoviruses. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases in wild birds*. Iowa: Blackwell, 2007. p.3–16.
- LEMONS, M.; DA SILVA, G. M.; FEDULLO, L. P. L.; ALMEIDA-PEREIRA, V. L. *Salmonella* in wild birds in the Rio de Janeiro Zoological Garden, Brazil. *Rev. Bras. Ciên.Vet.*, v. 6, n. 1, p. 40-43, 1999.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M. (Ed.) *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 722-744.
- LIERZ, M.; SCHMIDT, R.; BRUNNBERG, L.; RUNGE, M. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from Free-ranging Birds of Prey in Germany. *J.Vet. Med.* Vol. 47, p. 63 – 67, 2000.
- LIERZ, M.; HAGEN, N.; HARCOURT-BROWN, N. *et al.* Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, v. 36, n. 2, p. 145-150, 2007.
- LIERZ, M.; HAGEN, N.; LUESCHOW, D.; HAFEZ, H.M. Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. *Avian Pathol.* v. 37, n. 5, p. 471-476, 2008a.
- LIERZ, M.; HAGEN, N.; HERNANDEZ-DIVERS, S.J.; HAFEZ, H.M. Occurrence of Mycoplasmas in free-ranging birds of prey in German. *J. Wildl. Dis.* v. 44, n. 4, p. 845–850, 2008b.
- LINDH, E.; HUOVILAINEN, A.; RÄTTI, O. *et al.* Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. *Viol. J.*, v. 35, n. 5, 2008.
- LOPES, L. F. L. *Salmonella sp. em répteis e aves silvestres no estado de São Paulo: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o manejo de cativeiro e reintrodução*. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 2008.
- LONG, J. R. Necrotic enteritis in broiler Chickens I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Can. J. Comp. Med.*, v. 37, p. 302-308, 1973.
- LONG, J. R.; PETTIT, J. R.; BARNUM, D. A. Necrotic Enteritis in broiler chickens II. Pathology and proposed pathogenesis. *Can. J. Comp. Med.*, v. 38, p. 467-474, 1974.
- LONG, J. R.; TRUSCOTT, R. B. Necrotic enteritis in broiler chickens III. Reproduction of the disease. *Can. J. Comp. Med.*, v. 40, p. 53-59, 1976.
- LUTTRELL, M. P.; FISCHER, J. R.; STALLKNECHT, D. E.; *et al.* Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.*v. 40, n. 2, p. 335-341, 1996.
- LUTTRELL, P.; FISCHER, J. R. Mycoplasmosis. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases in wild birds*. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p.317-331.

- MANWELL, R.D.; SESSLER, G.L. Malaria parasites of toucans. *J. Protozool.*, v.18, n. 4, p.570-574, 1971.
- MARQUES, M. V. R. *Avaliação sanitária de cracídeos e tinamídeos de cativeiro no estado de Minas Gerais*. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- MARQUES, M. V. R.; FERREIRA JUNIOR, F. C.; ANDERY, D. A. *et al.* Health assessment of captive tinamids (Aves, Tinamiformes) in Brazil. *J. Zoo Wildl. Dis.* v. 43, n. 3, p.539-48, 2012.
- MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; CAUWERTS, K. *et al.* Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 3-7, 2004.
- MARTINSEN, E. S.; WAITE, J. L.; SCHALL J. J. Morphologically defined subgenera of *Plasmodium* from avian hosts: test of monophyly by phylogenetic analysis of two mitochondrial genes. *Parasitol.*, v. 134, p. 483-490, 2007.
- MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L.; SCHALL J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecul. Phylogenet. Evol.*, v. 47, p. 261-273, 2008.
- MARZAL, A.; RICKLEFS, R. E.; VALKIŪNAS, G. *et al.* Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One*, v. 6, n. 7, e21905, 2011.
- MATUSHIMA, E.R. Técnicas necroscópicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. Cap 61, p. 980-990.
- McDOUGALD, L. R. Coccidiosis. In: SAIF, Y. M. *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 974-991.
- McORIST, S.; REECE, R. Clostridial enteritis in free-living lorikeets (*Trichoglossus* sp.). *Avian Pathol.*, v. 21, p. 503-507, 1992.
- MEER, R. R.; SONGER, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 58, n. 7, p. 702-705, 1997.
- MENÃO, M. C.; BOTTINO, J. A.; BIASIA, I. *et al.* Infecção por *Salmonella Typhimurium* em Arara Azul (*Anodorynchus hyacinthinus*). *Arq. Instit. Biológ.* v.67, n.1, p 43-47, 2000.
- MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R. A. *et al.* Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecol.*, v. 33, p. 329-340, 2008.
- MIKAELIAN, I.; DAIGNAULT, D.; DUVAL, M. C. *et al.* *Salmonella* infection in wild birds from Quebec. *Can.Vet. J.*, v. 38, p. 385, 1997.
- MIKAELIAN, I.; LEY, D.H.; CLAVEAU, R. *et al.* Mycoplasmosis in evening and pine grosbeaks with conjunctivitis in Quebec. *J. Wildl. Dis.*,v.37, n.4, p. 826–830, 2001.
- MIKICH, S. B. Order Piciformes (toucans, woodpeckers). In: FOWLER, M. E. *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Iowa State University Press. 2001. p. 181-186.
- MILLER, P.J.; DECANINI, E.L.; AFONSO, C.L. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Genet. Evol.* v.10, n.1, p. 26–35, 2010.

- MUNIZ, J.; SOARES, R. Sobre uma espécie de *Plasmodium* parasita do *Ramphastos toco* [Muller, 1776]: *Plasmodium huffi* n. sp. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v.3, p.339-356, 1951.
- MUNIZ, J.; SOARES, R. Nota sobre um parasita do gênero *Plasmodium* encontrado no *Ramphastos toco* [Müller, 1776], e diferente do *Plasmodium huffi*: *Plasmodium pinottii* n. sp. *Revist. Brasil. Malariol. Doenças Trop.*, v.6, p.611-617, 1954.
- MUNSON, L.; COOK, R. A. Monitoring, investigation and surveillance of diseases in captive wildlife. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v. 24, n. 3, p. 281-290, 1993.
- MURATTA, K. Prevalence of blood parasite in Japanese wild birds. *Parasitology*, v. 64, n. 9, p. 785-790, 2002.
- MURPHY, F. A.; BROOKS, D. L.; BOYCE, W. M. *et al.* An international system for the prevention and control of infectious diseases in free-ranging and captive wild animals. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v. 24, n. 3, p. 365-373, 1993.
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F.; BARRETO, M. L. Avian Mycoplasmosis Update. *Braz. J. Poult Sci.* v.7, n.1, 01, p.01 – 09, 2005.
- NELDER, M. P.; REEVES, W. K.; ADLER, P. H. *et al.* Ectoparasites and associated pathogens of free-Roaming and captive animals in zoos of South Carolina. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 9, n. 5, p. 469-477, 2009.
- NEWMAN, S. H.; PADULA, V.M., CRAY C. *et al.* Health assessment of Black-crowned Night-herons (*Nycticorax nycticorax*) of the New York Harbor estuary. *Comp. Biochem. Physiol.*, n. 148, part B, p. 363-374, 2007.
- OKOH, A. E. Newcastle disease in falcons. *J. Wildl. Dis.*, v.15, p.3, p. 479-480, 1979.
- OLIVEIRA JR, J. G.; PORTZ, C.; LOUREIRO B. O. *et al.* Avaliação sorológica do Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no estado do Rio de Janeiro (atualização). *Ciê. Rural*, v. 33, n. 2, 2003.
- ORTEGO, J.; CORDERO, P. J.; APARICIO, J. M. *et al.* Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of lesser kestrels (*Falco naumanni*). *J. Ornithol.*, v. 149, p. 337-343, 2008.
- PADILLA, L. R.; HUYVAERT, K. P.; MERKEL, J. L.V.T. *et al.* Hematology, plasma chemistry, serology, and *Chlamydophila* status of the waved albatross (*Phoebastria irrorata*) on the Galapagos islands. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v. 34, n. 3, p. 278-283, 2003.
- PAGENKOPP, K. M.; KLUCKA, J.; DURRANT, K. L. *et al.* Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *Conserv. Genet.*, v. 9, p. 1557-1588, 2008.
- PALINAUSKAS, V.; VALKIUNAS, G.; BOLSHAKOV, C. V. *et al.* *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experim. Parasitol.*, v. 120, p. 372-380, 2008.
- PALINAUSKAS, V.; VALKIŪNAS, G.; KRIŽANAUSKIENE A. *et al.* *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone™. *Experim. Parasitol.*, v. 123, p. 134-139, 2009.
- PATANÉ, J. S. L. *Filogenia molecular e biogeografia das espécies e subespécies do*

- gênero *Ramphastos* (Piciformes: *Ramphastidae*). 2007. 145f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- PAULILLO, A.C.; DA SILVA, G.S.; DORETTO JUNIOR, L. *et al.* Importancia das perdizes (*Rhynchotus rufescens*) como fonte potencial de vírus patogênico da doença de Newcastle para aves domésticas. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.3, p.313-317, 2005.
- PEARSON, G.L., McCANN, M.K. The role of indigenous wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1972-1973. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 167, n. 7, p.610-614, 1975.
- PENNYCOTT, T. W.; DARE, C. M.; YAVARI, C. A. *et al.* *Mycoplasma sturni* and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds in Scotland. *Vet. Rec.*, v. 156, p. 513-515, 2005.
- PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER; H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Vet. Rec.*, v. 158, p. 817-820, 2006.
- PETROVAY, F.; BALLA, E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J. Med. Microbiol.*, v. 57, p. 1296–1298, 2008.
- PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P. *et al.* Characterization of *Clostridium perfringens* Iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 12, p. 5147-5156, 1993.
- PIZO, M. A.; DONATTI, C. I.; GUEDES, N. M. R. *et al.* Conservation puzzle: Endangered hyacinth macaw depends on its nest predator for reproduction. *Biol. Conserv.*, v. 141., 792-796. 2008.
- POVEDA, J.B.; GIEBEL, J.; KIRCHHOFF, H. *et al.* Isolation of mycoplasmas from a buzzard, falcons and vultures. *Avian Pathol.* v.19, n. 4, p.779-783, 1990.
- PRICE, R. D.; HELLENTHAL, R. A.; WECKSTEIN, J. D. The genus *Myrsidea* Waterson (Phthiraptera: Menoponidae) from the toucans (Piciformes: *Ramphastidae*), with descriptions of three new species. *Zootaxa.*, v. 613, p. 1-18, 2004.
- PRICE, R. D.; WECKSTEIN, J. D. The genus *Austrophilopterus* Ewing (Phthiraptera: Philopteridae) from toucans, toucanets, and araçaris (Piciformes: *Ramphastidae*). *Zootaxa.*, v. 918, p. 1-18, 2005.
- RASO, T.F.; BERCHIERI JR, A.; PINTO, A.A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrot in Brazil. *J. Zoo and Wildl. Med.* v.33, n.2, p. 118–121, 2002.
- RASO, T.F.; TEIXEIRA, R.H.F; VAZ, F.J. *et al.* Pesquisa de *Chlamydophila psittaci* em ramphastídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. In: Congresso da associação brasileira de veterinários de animais selvagens, 9., 2005, São José do Rio Preto, SP.; Encontro da associação brasileira de veterinários de animais selvagens, 14., 2005, São José do Rio Preto, SP. *Anais do IX Congresso e XIV Encontro da ABRAVAS, ABRAVAS, 2005. p. 78.*
- RASO, T. F.; GODOY, S. N., MILANELO, L. *et al.* An outbreak of chlamydiosis in captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *J. Zoo Wildl. Dis.*, v. 35, n. 1, p. 94-96, 2004.
- RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R. *et al.* *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots

- (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.117, n.2-4, p. 235–241, 2006.
- RASO, T. F.; CARRASCO, A. O. T.; SILVA, J. C. R. *et al.* Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. *Zoonoses Public Health* v. 57, p. 411-416, 2008.
- RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO *et al.* Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitology*, v. 130, p. 1–7, 2005.
- RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. Lond. Sec. B.*, v. 269, p. 885-892, 2002.
- REFSUM, T.; HANDELAND, K.; BAGGESEN, D. L. *et al.* Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, n. 11, p. 5595–5599, 2002.
- ROBINSON, R. A.; LAWSON, B.; TOMS, M. P. *et al.* Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PLoS One.*, v. 5, n. 8, e12215, 2010.
- ROCKE, T. E.; YUILL, T. M.; AMUNDSON, T. E. Experimental *Mycoplasma gallisepticum* infections in captive-reared wild turkeys. *J. Wildl. Dis.*, v. 24, n. 3, p. 528-532, 1988.
- SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; VORIMORE, F. *et al.* DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.* v.135, n. 1-2, p. 22–30, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (Ed.). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, New York: CHSL Press, 2001.
- SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechnology*, v.17, n.5, p. 915-919, 1994.
- SANTOS, T.; OLIVEIRA, J. B.; VAUGHAN C. *et al.* Health of an *ex situ* population of raptors (Falconiformes and Strigiformes) in Mexico: diagnosis of internal parasites. *Int. J. Trop. Biol.*, v. 59, n. 3, p. 1265-1274, 2011.
- SASAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, Y. *et al.* Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* e *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Vet. Microbiol.*, v. 83, p. 61-69, 2001.
- SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L. L. *et al.* Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *J. Parasitol.*, v. 89, n. 5, p. 1025-1033, 2003.
- SEKI, Y.; SCHNEIDER, M. S.; MEYERS, M. A. Structure and mechanical behavior of a toucan beak. *Acta Mater.*, v. 53, p. 5281–5296, 2005.
- SHARPLES, E.; BAINES, S. J. Prevalence of *Chlamydophila psittaci*-positive cloacal PCR tests in wild avian casualties in the UK. *Vet. Rec.*, v. 164, p. 16-17, 2009.
- SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. In: SAIF, Y. M. *Dis. poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State, 2003. p.568-582.
- SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 862p.

- SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, p. 262-264, 2009.
- SLAVIĆ, D.; BOERLIN, P.; FABRI, M. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can. J. Vet. Res.*, v. 75, p. 89-97, 2011.
- SMITH, K. A.; CAMPBELL, C. T.; MURPHY, J. *et al.* Compendium of measures to control *Chlamydochlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2010. National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV).
- SMITH, K. F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A. B. The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv.*, v.12, p. 1-12, 2008.
- SMITH, K.M.; KARESH, W. B.; MAJLUF, P. *et al.* Health Evaluation of free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. *Avian Dis.*, v. 52, n. 1, p. 130-135, 2008.
- SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol.*, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1996.
- SOUSA, E. *Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas as instalações avícolas.* 2007. Dissertação (Mestrado em patologia animal). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- SOUSA, E.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; PINTO, A. A. Prevalence of *Salmonella* spp. antibodies to *Toxoplasma gondii*, and Newcastle disease virus in feral pigeons (*Columba livia*) in the city of Jaboticabal, Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 41, n. 4, p. 603-607, 2010.
- STONE, E. G.; MONTIEL-PARRA, G.; PÉREZ, T. M. *et al.* A survey of selected parasitic and viral pathogens in four species of mexican parrots, *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, and *Rhynchopsitta pachyrhyncha*. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 36, n. 2, p. 245-249, 2005.
- STURROCK, H.J.W.; TOMPKINS, D.M. Avian malaria in african yellow-eyed-penguins: Investigating the cause of high seroprevalence but low observed infection. *New Zealand Vet. J.*, v.55, p.158-160, 2007.
- SZYMANSKI, M. M.; LOVETTE, I. J. High lineage diversity and host sharing of malarial parasites in a local avian assemblage. *J. Parasitol.*, v. 91, n. 4, p. 768-774, 2005.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, n. 121, v. 2, 2012.
- TRAVIS, E. K.; VARGAS, F. H.; MERKEL, J. *et al.* Hematology, plasma chemistry, and serology of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galápagos Islands, Ecuador. *J. Wildl. Dis.*, v. 42, n. 1, p. 133-144, 2006a.
- TRAVIS, E. K.; VARGAS, F. H.; MERKEL, J. *et al.* Hematology, serum chemistry, and serology of Galápagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos islands, Ecuador. *J. Wildl. Dis.*, v.42, n. 3, p. 625-632, 2006b.

- THIOLLAY, J. M. Effects of hunting on guianan forest game birds. *Biodivers. Conservat.*, v. 14, p. 1121-1135, 2005.
- UHART, M. M.; QUINTANA, F.; KARESH, W. B. *et al.* Hematology, plasma biochemistry, and serosurvey for selected infectious agents in southern giant petrels from Patagonia, Argentina. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v. 39, n. 2, p.359-365, 2003.
- UPTON, S. J.; ERNST, J. V.; CLUBB, S. L. *et al.* *Eimeria forresteri* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Ramphastos tacho* and a redescription of *Isoospora graculai* from *Gracula religiosa*. *Syst. Parasitol.*, v. 6, p. 237-240, 1984.
- URIBE A. J. R., RODRÍGUEZ F. I., HERNANDEZ N. I. C. *et al.* Diagnóstico de enteritis necrótica en tucanes (*Ramphastos tacho*). *Rev. Electrón. Clíni. Vet.*, v. 3, n. 3, p. 1-6, 2008.
- VALIM, M. P.; TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM M. *et al.* Malófagos (Phthiraptera) recolhidos de aves silvestres no zoológico de São Paulo, SP, Brasil. *Revis. Bras. Entomol.*, v. 49, n. 4, p. 584-587, 2005.
- VALKIŪNAS, G. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. Boca Raton: CRC, 2005. 935p.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIŽANAUSKIEN, A. *et al.* A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J. Parasitol.*, v. 94, n. 6, p. 1395-1401, 2008.
- VAN ASTEN, A. J.A.M.; NIKOLAOU, G. N.; GRÖNE, A. The occurrence of *cpb2*-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J.*, v. 183, p. 135-140, 2010.
- VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F. *et al.* *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.*, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.
- VIEIRA, A. A. S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. *et al.* Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, n. 4, p. 513-516, 2008.
- WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 1545-1554, 2002.
- WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D. *et al.* A new Nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J. Parasitol.*, v. 90, n. 1, p. 191-194, 2004.
- WARNER, R.E. 1968. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic hawaiian avifauna. *Condor*, v.70, p.101-120, 1968.
- WATKINS, K. L.; SHRYOCK, T.R.; DEARTH, R.N. *et al.* In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microb.*, v. 54, p. 195-200, 1997.
- WOBESER G.; LEIGHTON, F. A.; NORMAN, R. *et al.* Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. *Can. Vet. J.*, v. 34, n. 6, p. 353-359, 1993.
- WOODFORD, M. H. Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release into the wild. IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group, the Office International des Epizooties (OIE), Care for

the Wild, U.K., European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. 2010.

WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNET, J. F. Prevalence of avian hematozoa in São Paulo state, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 84, n. 4, p. 515-526, 1989.

YABSLEY, M. J. Capillarid nematodes. In: ATINKSON, C.T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. Parasitic diseases of wild birds. Iowa: Wiley-Blackwell. 2008. p. 463-497.

YOHANNES, E.; HANSSON, B.; LEE, R. W. *et al.* Isotope signatures in winter moulted feathers predict malaria prevalence in a breeding avian host. *Oecologia*, v. 158, p. 299-306, 2008

ZANETTI, F.; BERINSTEIN, A.; PEREDA, A. *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian Dis.* v.49, n.4, p. 546-550, 2005.

Apêndice 1: Animais pesquisados no presente estudo, demonstrando a detecção ou não dos quatro grupos de agentes etiológicos encontrados (*Plasmodium* spp., *Clostridium perfringens*, endoparasitos e ectoparasitos)

Local	Animal	Plasm.	C. perfr.	Endo.	Ecto.
CETAS/BH	RT1	Positivo	N	N	N
	RT2	N	N	Coccídeos	N
	RT3	N	-	N	N
	RT4	Positivo	-	<i>Eimeria</i> spp.	Ácaros
	RT5	N	N	Coccídeos	N
	RT6	N	N	N	N
	RT7	Positivo	N	N	N
	RT8	N	N	N	N
	RT9	N	N	N	Piolhos
	RT10	N	N	Coccídeos	N
	RT11	N	N	N	N
	RT12	N	-	N	N
	RT13	N	N	N	N
	RT14	N	N	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT15	N	CpA B2	N	N
	RT16	N	CpA	N	N
	RT17	N	N	N	N
	RT18	Positivo	N	N	N
	RT19	N	N	N	N
	RT20	N	N	N	N
	RT21	N	N	N	N
	RT22	N	N	N	N
	RT23	Positivo	N	N	N
	RT24	Positivo	N	N	N
	RT25	Positivo	N	N	N
	RT26	Positivo	N	N	N
	RT27	Positivo	N	N	N
	RT28	Positivo	N	N	N
	RT29	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT30	Positivo	N	N	N
	RT31	Positivo	N	N	Ácaros
	RT32	N	N	N	Ácaros
	RT33	N	N	Coccídeos	N
	RT34	Positivo	N	N	N
	RT35	Positivo	N	N	N
	RT36	Positivo	N	N	N
	RT37	N	N	N	N
	Total				
CETAS MOC	RT38	Positivo	N	-	N
CPC	RT39	N	N	-	N
	RT40	N	CpA B2	-	N
	RT41	N	-	N	N

	RT42	N	N	N	N
	RT43	N	N	N	N
	RT44	N	N	N	N
	RT45	Positivo	-	N	N
	RT46	Positivo	N	-	N
	RT47	N	N	-	N
	RT48	N	CpA B2	-	N
	RD1	N	N	N	Piolho
	RD2	Positivo	N	N	N
	RD3	N	N	N	N
	RD4	N	N	N	N
	RD5	Positivo	N	N	N
	RD6	Positivo	CpA	Capillar.	N
	RD7	N	N	Capillar.	N
	RD8	N	N	Capillar.	N
	RD9	N	N	Capillar.	N
	RD10	N	N	Capillar.	N
	RD11	Positivo	N	Capillar.	N
	RD12	N	N	-	N
	RD13	N	N	-	N
	RD14	N	N	-	N
	RV1	Positivo	N	Capillar.	
	RV2	N	N	Capillar.	
	RV3	N	N	Coccídeos	Piolho
	RV4	Positivo	N	Coccídeos	Piolho
	RV5	Positivo	N	N	
	RV6	N	N	N	Piolho
	RV7	Positivo	N	Coccídeos	Piolho
	RV8	N	N	Coccídeos	Piolho
	RV9	N	N	Capillar.	Piolho
	A1	Positivo	N	-	N
	A2	N	N	N	N
	A3	N	N	N	N
	A4	Positivo	N	N	N
	A5	N	N	N	N
	A6	N	N	N	N
	A7	N	N	-	N
	A8	Positivo	N	N	N
PETI	RT49	Positivo	-	N	N
	RT50	N	-	N	N
FZ BH	RT51	Positivo	-	Capillar.	N
	RT52	N	CpA	Capillar.	Piolho
	Rtuc	N	N	Capillar.	N
FZ MOC	RT53	N	N	-	N
	RT54	Positivo	N	-	N
	RT55	N	N	-	N
HOVET AC	RT56	Positivo	-	N	N

	RT57	N	-	N	N
	RT58	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT59	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT60	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT61	Positivo	CpA	<i>Eimeria</i> spp.	N
	RT62	-	CpA	<i>Eimeria</i> spp.	Piolho
	RT63	N	N	<i>Eimeria</i> spp.	Piolho
	RT64	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	Piolho
	RT65	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	Piolho
	RT66	Positivo	N	<i>Eimeria</i> spp.	Piolho
MF Belvedere	Rtuc2	N	N	N	N
	Rtuc3	N	N	N	N
	Rtuc4	N	N	N	N
	A9	N	N	N	N
	A10	N	CpA	N	N
	A11	N	N	N	N
	A12	N	N	N	N
MF Bem Viver	RT67	N	N	-	N
MF Mozart	RT68	Positivo	N	N	N
MF Veredas	RT69	Positivo	N	N	N
	RT70	N	CpA	N	N
	RT71	Positivo	N	-	N
	RT72	Positivo	N	-	N
	RT73	Positivo	N	N	Piolho
	RT74	Positivo	N	N	Piolho
	RT75	Positivo	N	N	N
	RT76	Positivo	-	N	N
	RT77	Positivo	CpA	-	N
	Rtuc5	N	N	N	N
	Rtuc6	N	N	N	N
	A13	Positivo	N	-	N
	A14	N	N	-	N
	A15	N	N	N	N
MF WR	RT78	N	-	Coccídeos	Ácaros
	RT79	N	-	N	Ácaros
	RT80	N	N	N	Ácaros
	RT81	N	N	Coccídeos	Ácaros
	RT82	N	N	Coccídeos	Ácaros
	RT83	N	N	N	Ácaros
	RT84	Positivo	N	N	N
	RD15	Positivo	N	N	N
	RD16	Positivo	N	N	Ácaros
	RD17	N	N	N	Ácaros
	RD18	N	N	N	Ácaros
	RD19	N	N	N	N
	Rtuc7	N	N	N	N
	Rtuc8	N	N	N	Ácaros

FVV	RT85	N	-	Coccídeos	N
	RT86	N	N	N	N
	RT87	Positivo	N	N	N
	RT88	Positivo	N	Nemat.	N
	RD20	N	N	Nemat.	N
	RD21	Positivo	N	N	N
	RD22	N	-	N	N
	RD23	Positivo	-	-	N
	Rtuc9	N	N	N	N

C. perfr. = *Clostridium perfringens*; Endo. = endoparasitos; Ecto. = Ectoparasitos.

CpA = *C.perfringens* tipo A; CpA B2 = *C. perfringens* tipo A com amplificação do gene codificador da toxina beta-2 (*cpb2*); Nematod. = larva de nematódeo; N = negativo; - = não avaliado..

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 14/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação sanitária de Ramphastideos mantidos em cativeiro no estado de Minas Gerais**", que tem como responsável(is) **José Sérgio de Resende**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **30/ 03/2011**.

Este certificado expira-se em **30/ 03/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 14/2011**, related to the project entitled "**Health assessment of ramphastids in captivity in Minas Gerais state**", under the supervisors of **José Sérgio de Resende**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 30, 2011**.

This certificate expires in **March 30, 2016**.

Belo Horizonte, 18 de Abril de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24619-1	Data da Emissão: 17/09/2010 08:57
Dados do titular	
Nome: Francisco Carlos Ferreira Junior	CPF: 076.574.546-10
Título do Projeto: Avaliação sanitária de ranfastídeos de cativeiro no estado de Minas Gerais	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	CNPJ: 17.217.985/0034-72

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Preparação dos protocolos	07/2010	10/2010
2	Revisão de literatura	07/2010	12/2010
3	Colheita de material biológico	09/2010	09/2011
4	Processamento do material	09/2010	09/2011
5	Tabulação e análise dos resultados	04/2011	10/2011
6	Redação e apresentação da dissertação	01/2012	03/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Danielle de Assis Andery	Pesquisador colaborador	063.558.006-38	MG 8143123 SSP-MG-MG	Brasileira
2	José Sérgio de Resende	Orientador	280.204.806-68	M-1.745.808 SSP-MG-MG	Brasileira
3	DANIEL AMBROZIO DA ROCHA VILELA	Pesquisador colaborador	972.409.586-04	M7168816 SSP/MG-MG	Brasileira
4	Alessandra Vitelli de Araujo	Pesquisador colaborador	067.483.586-71	MG 10196963 SSP-MG-MG	Brasileira
5	Nelson Rodrigo da Silva Martins	Orientador	199.767.470-04	7000498902 SSP-RS	Brasileira
6	Marcus Vinicius Romero Marques	Pesquisador colaborador	068.849.996-16	8699299 II-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELO HORIZONTE	MG	Criatórios conservacionistas em Minas Gerais	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79222972



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24619-1	Data da Emissão: 17/09/2010 08:57
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Francisco Carlos Ferreira Junior	CPF: 076.574.546-10
Título do Projeto: Avaliação sanitária de ranfastídeos de cativeiro no estado de Minas Gerais	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	CNPJ: 17.217.985/0034-72

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ramphastidae
---	--	--------------

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Sangue, Penas, Regurgitação/conteúdo estomacal, Fezes
---	----------------------------	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	Laboratório de doenças das aves da UFMG
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	Laboratório de doenças das aves da UFMG

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79222972



Página 2/3