

LUIZ CÉSAR DA SILVA

Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soroepidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthio camelus*) no Estado do Paraná

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
 Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo epidemiológico de criações comerciais de avestruz (*Sthruio camelus*) do Estado do Paraná", Protocolo nº 278/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Epidemiologic study of farmer ostrich (*Sthruio camelus*) in Paraná State, Brazil", protocol number 278/2003, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 01 de abril de 2003

Prof^a Dr^a 
 Presidente da Comissão de Bioética
 FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Luiz César da

Título: Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soropidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthio camelus*) no Estado do Paraná

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa Sirley companheira fiel nesta jornada.

*As minhas filhas Ana Beatriz e Natália Luiza que sempre foram a minha fonte de
inspiração*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Antonio Jerez pela valiosa colaboração e paciência demonstrada nas dificuldades que foram encontradas neste longo caminho.

Ao amigo Alexandre Sanches que nunca mediu esforços para auxiliar na execução dos trabalhos sendo um exemplo de dedicação.

A Laura, Paulo e Fábio que sempre me apoiaram principalmente nas horas mais difíceis, onde conhecemos os verdadeiros amigos.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pela disponibilização de seu laboratório sem a qual não poderia terminar este trabalho.

A Dr. Fábio Gregori pela realização da genotipagem das amostras de rotavírus no Instituto Biológico de São Paulo.

A Dra. Elenice Sachettin Cunha pela realização da soroneutralização para vírus da Encefalomielite Equina no Instituto Biológico de São Paulo.

Ao Dr Cláudio Moraes de Andrade pela disponibilização da amostra do vírus da Influenza.

Ao Prof. Dr Júlio César de Freitas pela realização da MAT para leptospiras.

Aos muitos amigos pós-graduandos do VPS.

Aos funcionários do VPS que trabalham no dia a dia de forma silenciosa, realizando um trabalho tão importante de apoio aos pós-graduandos.

As funcionárias da biblioteca pela atenção carinhosa e competente nesta árdua missão.

A todos que diretamente e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	-porcentagem.
°C	- graus Celsius.
/mL	- por mililitro.
µg	- micrograma.
µL	- microlitro.
µm	- micrômetro.
1 ^a	- primeira.
2 ^a	- segunda.
DEPC	- Dietilpirocarbonato.
DL ₅₀	- Dose letal 50% em animais.
dNTP	- dinucleotídeo trifosfato
DTT	- ditionitrosol
EEE	- Vírus da encefalomielite equina tipo Leste.
VEE	- Vírus da encefalomielite equina tipo Oeste.
WEE	- Vírus da encefalomielite equina tipo Venezuelana.
EMJH	- Meio Ellinghausen McCullough Johnson Harris.
et al.,	- e colaboradores.
EUA	- Estados Unidos da América.
G	- força gravitométrica.
Graf.	- gráfico.
H	- hemaglutinina.
HE	- Meio de Hektoen
IgA	- Imunoglobulina A.
IgG	- Imunoglobulina G.
IgM	- Imunoglobulina M.
IM	- Intramuscular.
mL	- mililitro.
mA	- miliampere / hora.
MAT	- soroaglutinação microscópica.
MC	- Meio de MacConkey.
MDa	- Megadaltos.
MEM	- Meio mínimo de Eagle.
MG	- <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .
MI	- <i>Mycoplasma iowae</i> .
MM	- <i>Mycoplasma meleagridis</i> .
MS	- <i>Mycoplasma synoviae</i> .
N	- Neuraminidase.
NaCl	- Cloreto de Sódio.
NCDV	- Nebraska Calf Diarrhea vírus.
nm	- nanômetro.
PT	- Fagotipo.
SC	- sub cutâneo.
SDS	- Lauril sulfato de sódio.
SP	- São Paulo.
SS	- Meio Salmonella Shigella Ágar
SV	- soro variante.
Tab.	- Tabela.
TCID ₅₀	- Dose infectante 50% em cultura de células.
USP	Universidade de São Paulo.
VI	- Vírus da Influenza.
VO	- por via oral.
VPS	-Departamento de Med. Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

OBS: Visto estarem consagradas na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no idioma inglês.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01-	Representação de forma tridimensional da partícula dos rotavírus.....	26
Figura 02-	Relação entre os segmentos genômicos do dsRNA e a codificação das proteínas estruturais e não estruturais dos rotavírus.....	27
Figura 03-	Epidemiologia do vírus da Influenza mostrando diferentes hospedeiros e destacando o papel das aves como reservatório da Influenza.....	32
Figura 04-	Representação de forma tridimensional mostrando os componentes do vírus da Influenza.....	33
Figura 05-	Representação da reorganização genética do vírus da Influenza mostrando diferentes hospedeiros e destacando o papel do suíno como principal agente do processo.....	34
Figura 06-	Ilustração de uma bactéria do gênero <i>Leptospira</i> sp. Mostrando aspectos morfológicos da célula bacteriana.....	44
Figura 07-	Ilustração células de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> sp. mostrando detalhes como os flagelos e pilli.....	51
Figura 08-	Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando bandas de dsRNA do padrão NCDV na canaleta 13, ausência de bandas na canaleta 01 (controle negativo) e bandas dsRNA nas canaletas 02,03,04,05,06 e 07 com as amostras 2,3,4,5,6 e 7 respectivamente.....	95
Figura 09-	Monocamada confluyente de célula MA ₁₀₄ após 3 ^a passagem com 72 horas de cultura mostrando ausência de ECP.....	96
Figura 10-	Monocamada de células MA ₁₀₄ após 3 ^a passagem com 72 de cultura, mostrando ECP.....	96
Figura 11-	Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando bandas de dsRNA do padrão reovírus na canaleta 01, do padrão NCDV na canaleta 02 e das amostras 02, 03, 04, 05, 06, 07 nas canaletas 03, 04, 05, 06, 07,08 respectivamente. Na canaleta 09 observa-se ausência de bandas no controle negativo.....	97
Figura 12-	Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1 ^a amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus.....	99
Figura 13-	Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1 ^a tentativa de 2 ^a amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus.....	99
Figura 14-	Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 2 ^a tentativa de 2 ^a amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus.....	100
Figura 15-	Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1 ^a amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP4 (genótipos P) dos rotavírus.....	100
Figura 16-	Gel de agarose corado com brometo d etídio mostrando o produto da 2 ^a amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP4 (genótipos P) dos rotavírus.....	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 01-	Sorogrupos e alguns sorovares <i>L. interrogans</i> lato senso.....	45
Quadro 02-	Municípios do Estado do Paraná nos quais se localizam as propriedades de criação de avestruzes estudadas.....	64
Quadro 03-	Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados para genotipagem de rotavírus direcionados para o gene codificador da VP7 (genótipo G).....	70
Quadro 04-	Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados para genotipagem de rotavírus direcionados para o gene codificador da VP4 (genótipo P).....	71
Quadro 05-	Identificação das amostras de rotavírus para genotipagem....	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01-	Esquema ilustrativo da seqüência utilizada para a pesquisa de agentes em fezes de filhotes e de anticorpos com os soros sanguíneos e suabes de cloaca dos reprodutores.....	66
-------------	---	----

LISTAS DE TABELAS

Tabela 01-	Resultados da genotipagem utilizando a técnica da RT-PCR em rotavírus isolados de fezes de avestruzes colhidas em criações comerciais de municípios do Norte do Paraná. São Paulo 2006.....	101
Tabela 02-	Detecção de anticorpos anti-rotavírus pela técnica da CIEOF, em soros de 182 avestruzes de criações comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná, colhidos no período de junho de 2002 a junho de 2004. São Paulo, 2006.....	102
Tabela 03-	Resultado da MAT para sorovares de <i>Leptospira interrogans</i> em soros de reprodutores de criações comerciais de avestruzes em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006.....	104
Tabela 04-	Resultados da soro aglutinação em placa para detecção de anticorpos anti-Salmonella <i>pullorum</i> em soros de avestruzes de criações comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006.....	105
Tabela 05-	Resultados obtidos da soro aglutinação em placa para detecção de anticorpos anti- <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> em soros de avestruzes de criações comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006.....	106

RESUMO

SILVA, L. C. **Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soroepidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthio camelus*) no Estado do Paraná.** [Detection of rotavirus infection and serosurvey of some pathogens with zoonotic potential in ostriches (*Struthio camelus*) in Paraná State]. 2006, 150 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A criação industrial de avestruzes no Brasil tem crescido nos últimos anos, mas avestruzes podem ser reservatórios de agentes com potencial zoonótico, como é o caso do vírus da influenza, rotavírus, vírus da encefalomielite eqüina do leste (EEEV) e do oeste (WEEV), salmonela, leptospira e micoplasma. O objetivo deste trabalho foi detectar rotavírus nas fezes de filhotes, anticorpos contra rotavírus, EEEV e WEEV, influenza A, leptospira, salmonela e micoplasma a partir do soro de reprodutores e efetuar o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de suabe cloacal. Para a detecção de rotavírus nas fezes utilizaram-se as técnicas de PAGE, isolamento viral e genotipagem pela RT/PCR. As técnicas de contraimunoeletrosmoforese, soroneutralização em cultura de células, inibição da hemaglutinação e aglutinação em placa foram utilizadas nos levantamentos sorológicos e a cultura bacteriológica foi utilizada para detectar *Salmonella* spp. em suabes de cloaca. Rotavírus do grupo A com genótipos G[6], G[10], P[1] e P[7] foram detectados nas fezes de avestruzes e anticorpos anti-rotavírus em 10 amostras (10/182) de soros colhidos de avestruzes reprodutores. Foram detectados anticorpos para vários sorovares de *Leptospira* spp. (19/128), *Salmonella pullorum* (17/182), *Mycoplasma gallisepticum* (17/182) e *Mycoplasma synoviae* (47/182). Não foram detectados anticorpos anti-EEEV e WEEV e anti-vírus da Influenza A H₃, bem como amostras de *Salmonella* spp. em suabes de cloaca. Estes resultados permitem sugerir o papel do avestruz na cadeia epidemiológica das rotavirose e da

leptospirose e dão bases para o aprimoramento sanitário do plantel brasileiro desta ave.

Palavras-chave: Anticorpos, Avestruz, Genótipos, Leptospirose animal, Rotavírus.

ABSTRACTS

SILVA, L. C. **Detection of rotavirus infection and serosurvey of some pathogens with zoonotic potential in ostriches (*Struthio camelus*) in Paraná State** [Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soropidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthios camelus*) no Estado do Paraná]. 2006, 150 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

The industrial ostrich breeding in Brazil has grown in the last few years, but ostrich may be reservoirs of potentially zoonotic agents such as influenzavirus, rotavirus, eastern equine encephalitis virus (EEEV), western equine encephalitis virus (WEEV), *Salmonella*, *Leptospira* and *Mycoplasma*. The aim of the present study was to detect rotavirus in fecal samples of young ostriches, antibodies against rotavirus, EEEV e WEEV, influenza A , *Leptospira*, *Sallmonela* and *Mycoplasma* in sera from breeders and carry out *Salmonella* isolation in cloacal swabs. For the rotavirus detection, PAGE, viral isolation and genotyping with RT/PCR were used. Counterimmunoelectroosmophoresis, virus neutralisation assay in cell culture, hemagglutination inhibition and plate agglutination were used in the serological surveys and bacteriological culture was used to detetc *Salmonella* spp. in the cloacal swabs. Group A rotavirus with genotypes G[6], G[10], P[1] and P[7] was detected in the fecal samples and anti-rotavirus antibodies were detected in ten samples (10/182) from breeder ostriches. Antibodies to different serovars of *Leptospira* spp. (19/128), *Salmonella pullorum* (17/182), *Mycoplasma gallisepticum* (17/182) and *Mycoplasma synoviae* (47/182) were detected. Antibodies against EEEV, WEEV and influenzavirus A H₃ were not detected, as well as *Salmonella* spp. in swab samples. These results allow one to suggest a role to ostriches in the epidemiological chain of rotavirus diseases and leptospirosis and give basis to the improvement of the sanitary condition of the Brazilian flocks.

Key Words: Animal Leptospirosis, Antibodies, Genotypes, Ostriches, Rotavirus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	ROTAVÍRUS.....	25
2.2	INFLUENZA.....	31
2.3	ENCEFALOMIELEITE EQUINA (AMERICANA).....	39
2.4	LEPTOSPIROSE.....	43
2.5	SALMONELOSE.....	50
2.6	MICOPLASMA.....	56
3	OBJETIVOS.....	62
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	67
4.1.1	Colheita de Fezes.....	67
4.1.2	Colheita de Soros.....	68
4.1.3	Colheita de Suabes de Cloaca.....	68
4.2	PESQUISA DE ROTAVÍRUS.....	69
4.2.1	Amostra Padrão.....	69
4.2.2	Cultura de Células.....	69
4.2.3	Oligonucleotídeos Inicializadores (“primers”).....	70
4.2.3.1	Genótipo G.....	70
4.2.3.1	Genótipo P.....	70
4.2.4	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....	71
4.2.4.1	Diluição das Amostras Fecais.....	73
4.2.4.2	Extração do RNA Viral.....	72
4.2.4.3	Preparo do Gel de Poliacrilamida	73
4.2.4.4	Corrida Eletroforética.....	74
4.2.4.5	Coloração do Gel.....	74
4.2.5	Isolamento de Rotavírus.....	75
4.2.5.1	Tratamento das Fezes.....	76
4.2.5.2	Inoculação em Monocamada.....	76
4.2.6	Reação de RT/PCR/Genotipagem.....	77
4.2.6.1	Extração de RNA para a Reação de Transcriptase Reversa.....	77
4.2.6.2	Reação de Transcriptase Reversa.....	78
4.2.6.3	Primeira Amplificação.....	79
4.2.6.4	Segunda Amplificação.....	79
4.3	PESQUISA DE ANTICORPOS.....	80
4.3.1	Pesquisa de Anticorpos Anti-Rotavírus	80
4.3.1.1	Produção do Antígeno.....	81
4.3.1.2	Contraímunoeletrosmoforese (CIEOF).....	81
4.3.2	Pesquisa de Anticorpos Anti-Encefalomielite Equina dos Tipos Lestes e Oeste.....	82
4.3.2.1	Amostras de Vírus Padrão.....	83
4.3.2.2	Cultura de Células.....	83
4.3.2.3	Soroneutralização Viral em Cultura de Células.....	83
4.3.3	Pesquisa de Anticorpos Anti-Influenza.....	84
4.3.3.1	Amostras de Vírus.....	84
4.3.3.2	Ovos Embrionados de Galinha.....	85
4.3.3.3	Hemáceas de Galinha.....	85

4.3.3.4	Preparo do Antígeno Viral.....	85
4.3.3.5	Teste da Hemaglutinação (HI).....	86
4.3.4	Pesquisa de Anticorpos Anti-<i>Leptospira spp.</i>.....	87
4.3.4.1	Antígeno.....	87
4.3.4.2	Teste da Aglutinação Microscópica (MAT).....	88
4.3.5	Pesquisa de Anticorpos Anti-Salmonela.....	89
4.3.5.1	Antígenos.....	89
4.3.5.2	Soro Aglutinação em Placa.....	89
4.3.6	Pesquisa de Anticorpos Anti-Mycoplasma.....	90
4.3.6.1	Antiígenos.....	90
4.3.6.2	Soro Aglutinação em Placa.....	91
4.4	PESQUISA DE <i>Salmonella spp.</i> EM SUABE DE CLOACA DE REPRODUTORES.....	91
4.4.1	Enriquecimento.....	92
4.4.2	Isolamento.....	92
4.4.3	Leitura.....	92
5	RESULTADO.....	95
5.1	ROTAVÍRUS.....	95
5.2	ISOLAMENTO.....	96
5.3	CARACTERIZAÇÃO DE ROTAVÍRUS ISOLADOS DAS FEZES.....	97
5.4	GENOTIPAGEM.....	98
5.5	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ROTAVÍRUS PELA TÉCNICA DA CONTRAIMUNOELETROSMOFORESE	102
5.6	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-EEEV E WEE.....	103
5.7	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA <i>Influenza H₃N₈</i>	103
5.8	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leptospira sp.</i>	103
5.9	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Salmonella pullorum</i>	105
5.10	PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Mycoplasma gallisepticum e Mycoplasma Synoviae</i>	106
5.11	CULTURA BACTERIOLÓGICA DE SUABE DE CLOACA PARA ISOLAMENTO DE <i>Salmonella spp.</i>	107
6	DISCUSSÃO.....	109
7	CONCLUSÃO.....	128
	REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

As avestruzes pertencem às ratitas, grupo de aves não voadoras dividido em quatro ordens: *Rheiformes*, *Struthioformes* (avestruzes), *Casuariiformes* (ema) e *Apterygiformes* (kiwi), classificadas na família *Struthionidae*. O gênero *Struthios* apresenta cinco espécies distintas: *Struthios camelus australis*, *Struthios camelus camelus*, *Struthios camelus massaicus*, *Struthios camelus molybdoplanes* e *Struthios camelus syriacus* (SWAYNE et al., 1996).

As emas são ratitas naturais do Brasil. As avestruzes têm origem no continente Africano com habitat natural em savanas e desertos. A alimentação básica é constituída de fibras vegetais, tais como raízes, folhas, flores, sementes e pastagens. São consideradas monogástricas e herbívoras, com grande potencial para a exploração racional em pastagens. Em virtude da grande demanda pelos produtos de alto valor agregado, esse tipo de criação vem se popularizando em diversos países além da África do Sul, tais como Canadá, Estados Unidos da América do Norte, Austrália, Espanha, Itália e França. O rebanho mundial explorado zootecnicamente já se aproxima de quatro milhões de aves. No Brasil, com plantéis ainda em formação, existem cerca de 200 mil aves distribuídas em várias regiões do país. Estima-se que a sua plena industrialização possa ocorrer nos próximos três anos. A experiência de alguns criadores revela que a estruítocultura é uma opção econômica, pois o país oferece várias características naturais favoráveis tais como clima, alimentos, mão-de-obra e infra-estrutura pecuária de fácil adaptação. O Estado do Paraná apresenta uma estimativa de aproximadamente 3000 reprodutores, que pode ser considerado um plantel pequeno quando comparado aos Estados do Centro-Oeste do Brasil (ACAB, 2005).

Apesar do grande potencial de produtividade, a introdução de um animal exótico em nosso ecossistema deve se constituir em motivo de preocupação do ponto de vista de Sanidade Animal. A indústria avícola brasileira é responsável por uma das mais importantes fontes de divisas para o país. A introdução de um agente de doença desconhecida ou mesmo de doenças que estão sob controle representa um fator de alto risco para a avicultura industrial., Além disso, há que se considerar que alguns desses agentes apresentam potencial zoonótico, como é o caso da febre hemorrágica Criméia/Congo, influenza, Newcastle, rotavírus, encefalomielite eqüina, doença de Borna, salmonella, leptospira e micoplasma.

A pesquisa desses agentes ou de seus anticorpos específicos em criações comerciais de avestruzes representa uma contribuição à Saúde Pública e Sanidade Animal, visando à implantação de medidas de ordem profiláticas.

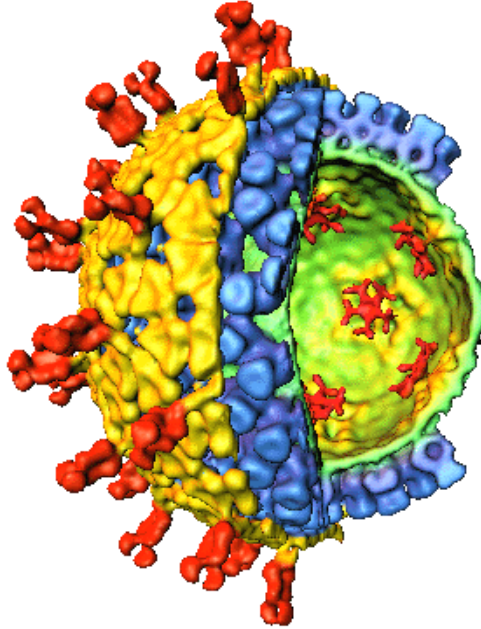
2 REVISÃO DE LITERATURA

A criação industrial de avestruzes no Brasil tem crescido nos últimos anos e se apresenta como mais uma importante alternativa para a produção de proteína de origem animal com redução de custos e melhor aproveitamento da área destinada às pastagens (CARRER; KORNFIELD, 1999). Um fator de preocupação é a entrada em nosso ecossistema de um animal exótico, que implica no cuidado redobrado na avaliação do impacto desta nova espécie no equilíbrio epidemiológico local, bem como evitar a introdução de novas doenças, algumas com potencial zoonótico. Dentre elas tem sido relatadas a doença de Newcastle, salmonelose, micoplasmose, micobacterioses, influenza aviária e febre hemorrágica Criméia/Congo e encefalomielite eqüina (BROWN; ROBERTS; PAGE, 1993; CAPUA et al., 2000; JORGENSEN et al., 1998; LEY et al., 2000; PANIGRAHY; SENNE; PEARSON, 1995; SWAYNE et al., 1996). A rotavirose, já descrita em outras espécies aviárias (ALFIERI et al., 1991; ALFIERI et al., 1994; ALFIERI et al., 1999; TAMEHIRO et al., 2003), ainda não foi citada em avestruzes.

2.1 ROTAVÍRUS

Pertencem à família *Reoviridae* e gênero *Rotavírus*, no qual estão incluídos os vírus da gastroenterite infantil e da diarréia neonatal dos animais. O nome provém do aspecto característico em forma de roda radiada, quando visualizados em microscopia eletrônica. A morfologia é predominantemente esférica com diâmetro

variando entre 55 e 75 nm. Não apresentam envelope e o capsídeo é formado com três camadas protéicas (Figura 01) (KAPIKIAN; CHANOCH, 1990).

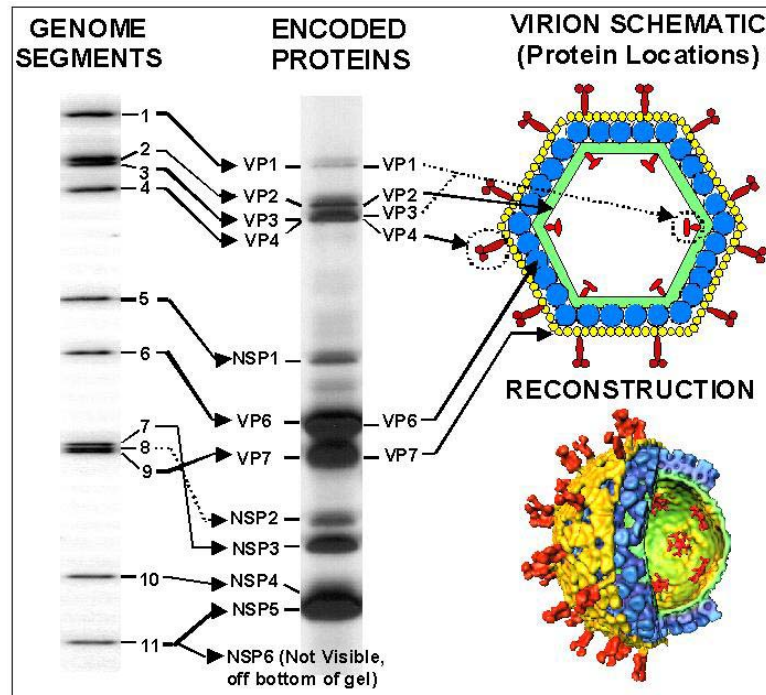


Fonte: J. Lawton and B.V.V. Prasad.

Figura 01-Representação da forma tridimensional da partícula viral dos rotavírus

A camada mais interna é denominada de core e engloba o genoma viral, um RNA de cadeia dupla (dsRNA) e segmentado, formado por 11 segmentos variando de 660 a 3.302 pares de bases (pb) e massa molecular de 2×10^5 a $2,2 \times 10^6$ Daltons, que apresentam diferentes migrações eletroforéticas em eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE). Cada segmento é responsável pela codificação de uma proteína, sendo seis estruturais (VP₁, VP₂, VP₃, VP₄, VP₆ e VP₇) e cinco não estruturais (NSP₁, NSP₂, NSP₃, NSP₄ e NSP₅). O genoma viral é circundado pela proteína VP₂ aderida às proteínas VP₁ e VP₃. Acima do core assenta-se a camada intermediária, ou capsídeo interno, formada por trimeros de VP₆, responsável pelos determinantes antigênicos de grupo e subgrupo, sendo o principal alvo nos testes

sorológicos para o diagnóstico laboratorial das rotaviroses (Figura 02)(MATSUI; MACKOW; GREENBERG, 1989).



Fonte: Eric Mossel , Mary Estes and Frank Ramig

Figura 02- Relação entre os segmentos genômicos e não genômicos do dsRNA e a codificação das proteínas estruturais e não estruturais dos rotavírus

Até o momento são conhecidos sete sorogrupos, que são denominados pelas letras de A até G; o sorogrupo A é o mais prevalente; os sorogrupos A, B e C podem acarretar infecção tanto no homem como nos animais (mamíferos e aves), sendo que o sorogrupo B já foi detectado em surtos de gastroenterite humana em adultos. Os sorogrupos D, E, F e G até o momento foram somente detectados em animais. No sorogrupo A, a proteína VP₆ é, ainda, responsável pelo aparecimento de subgrupos e na gastroenterite infantil já foram detectados quatro subgrupos: I, II, I e II e não I - nãoII. Acima do capsídeo interno assenta-se o capsídeo externo, formado pelas proteínas VP₄ e VP₇. A VP₇ é uma glicoproteína denominada pela letra G e

está envolvida com soroneutralização; é codificada pelo segmento nove e é a responsável pela constituição dos sorotipos G; até o momento são conhecidos 15 sorotipos G, identificados pela numeração de 1 a 15 ($G_1 \rightarrow G_{15}$). O VP₄ (88 kDa) é uma protease codificada pelo segmento quatro e denominada pela letra P; está envolvida em diversas funções: infectividade, virulência, hemaglutinação e indução de imunidade mediada por anticorpos. A sua clivagem por enzimas proteolíticas, tal como a tripsina, em VP₅ (60 kDa) e VP₈ (28 kDa) é que vai permitir a adsorção vírus-célula e a conseqüente infectividade; até o momento são conhecidos 21 sorotipos P ($P_1 \rightarrow P_{21}$) (ESTES, 1996; RODRIGUEZ et al., 2004).

Na constituição antigênica dos rotavírus estão, portanto, envolvidas as proteínas VP₆, VP₇ e VP₄ e a caracterização dos sorotipos G e P vem sendo realizada por técnicas de biologia molecular, razão pela qual recebem a denominação de genótipos e nesse caso a identificação dos mesmos deve conter os números entre colchetes ($G_{[1]} P_{[1]} \rightarrow G_{[15]} P_{[21]}$). O encontro de alguns genótipos em casos de gastroenterite infantil e em casos de diarreia nos animais demonstra que a transmissão de rotavírus entre animais e o homem podem ocorrer freqüentemente, especialmente em países menos desenvolvidos, com condições de higiene insatisfatória. A transmissão inter-espécies pode facilitar o aparecimento de amostras emergentes (ALFIERI et al., 1994; ALFIERI et al., 1999; BISHOP, 1994; BRITO, 1998; BUZINARO; JEREZ, 1998; BUZINARO et al., 2003; CHEN et al., 1985; ELSCHNER et al., 2005; ESTES, 1996; GATTI et al., 1989; GREGORI, 1999; LANGONI, 1988; PEDLEY et al., 1983; RANGEL FILHO; LIMA, 1987; SAN JUAN et al., 1986;)

A probabilidade de reorganização genética ou reagrupamento nos rotavírus sempre foi uma hipótese levada em conta devido ao dsRNA ser segmentado.

Estudos epidemiológicos de filogenia demonstram que a prevalência de determinados genótipos somente poderia ser possível com o mecanismo de reorganização (BANYAI et al., 2004; MAUNULA; BONSDORFF, 2002).

A reorganização genética pode ocorrer quando dois sorotipos geneticamente distintos fazem a co-infecção da célula hospedeira. A reorganização dos segmentos quatro e nove contribui para o aparecimento de um novo sorotipo ou genótipo, que pode aumentar a patogenicidade para uma determinada espécie. Em suínos foi verificado que co-infecções em intervalo de tempo de até seis horas entre as infecções e de amostras com taxa de multiplicação viral (MOI) idênticas promoveram maior número de amostras reorganizadas (TAUSCHER; DESSELBERGER, 1997)

No Brasil, o primeiro registro da detecção de rotavírus foi realizado por Linhares et al. (1977), em Belém do Pará. A partir daí surgiram várias publicações acerca da implicação dos rotavírus em gastroenterite infantil (LINHARES, 1997; LINHARES, 2000; TEIXEIRA et al., 1998)

Em diversos Estados a presença de rotavírus já foi assinalada em diferentes espécies animais: bovinos (BRITO, 1998; BUZINARO et al., 2003; JEREZ; CANDEIAS; DURIGON, 1987; JEREZ; CANDEIAS; DURIGON, 1989; LANGONI, 1988; RANGEL FILHO; LIMA, 1987); suínos (ALFIERI et al., 1994; ALFIERI et al., 1999; GATTI et al., 1989; GREGORI, 1999; SAN JUAN et al., 1986) e aves (ALFIERI et al., 1989a; ALFIERI et al., 1989b; TAMEHIRO et al., 2003).

No Estado do Paraná, Tamehiro et al. (2003) analisaram 378 amostras fecais de aves provenientes de granjas localizadas em diversas regiões do Estado e detectaram 32 positivas, das quais apenas três apresentaram migração eletroforética

compatível com o padrão para o sorogrupo A, sendo as demais consideradas atípicas.

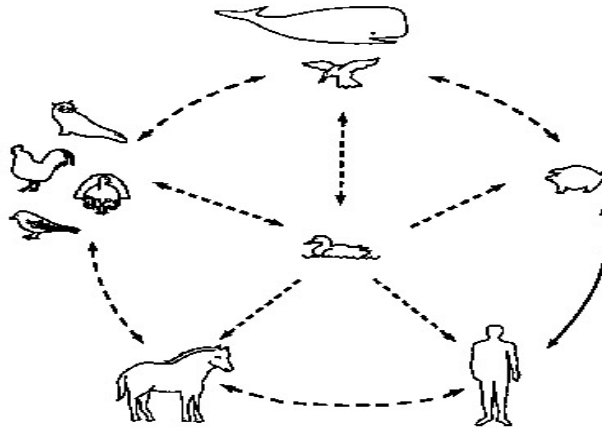
Na Argentina, as amostras provenientes de um surto de diarreia em uma criação de galinhas foram negativas no ELISA para o sorogrupo A. Pelo comportamento de migração eletroforética as amostras foram consideradas atípicas (BELLINZONE et al., 1987). Na Índia foi detectado por ELISA e PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) rotavírus aviário com as mesmas características de rotavírus mamífero do sorogrupo A (WANI et al., 2003). A detecção de rotavírus em galinhas foi descrita no Reino Unido e nos Estados Unidos da América do Norte (BERGELAND et al., 1977; MCNULTY; ALAN; MCCRACKEN, 1983; TODD; MCNULTHY, 1986). Na Itália, foram isoladas, em cultura de células da linhagem MA₁₀₄, amostras de rotavírus a partir de material fecal de faisões com sinais de enterite, provenientes de uma criação na região da Toscana. Todas apresentaram perfil eletroforético compatível com o sorogrupo A (LEGROTTAGLIE; RIZZI; AGRIMI, 1997).

Não há, até o presente momento e na literatura disponível, nenhuma descrição da presença de rotavírus em avestruzes, tampouco inquérito sorológico para a pesquisa de anticorpos específicos.

Várias técnicas já foram descritas para a detecção de anticorpos anti-rotavírus: soroneutralização; fixação do complemento, contraimunoeletroosmoforese (CIEOF), ELISA e imunofluorescência indireta (HAMMOND et al., 1984; WALRAVES et al., 1997). Dentre elas, destaca-se a CIEOF, que é bastante prática para o processamento de grande número de amostras, além de utilização de pequeno volume de reagentes (BRANDÃO et al., 2002).

2.2 INFLUENZA

A influenza é uma doença de distribuição universal e em torno de 20% das crianças e 5% dos adultos de todo o mundo desenvolvem sintomas da doença a cada ano. Acredita-se que a epidemia descrita por Hipócrates e Levy, em 412 a.C., deva ter sido causada pelo Vírus da Influenza (VI). A mais notável epidemia da doença foi a de 1918, com cerca de 20 milhões de mortes. Estima-se que de 1580 até 1918 ocorreram pelo menos oito epidemias. O substantivo feminino influenza pode ter vindo do latim *influo* (fluir para dentro), indicando sua transmissão aérea ou do italiano relacionado à “influenza” do tempo ou causas astrológicas e místicas. A doença apresenta sintomatologia ampla, que vai desde um quadro assintomático até uma síndrome respiratória. O VI pode acarretar lesões em vários órgão e tecidos, tais como pulmão, coração, fígado, rins, cérebro e músculos. A pneumonia inicial seguida de infecção bacteriana secundária pode ser fulminante. O período de incubação é de 2 a 3 dias e o curso da doença depende de vários fatores: idade do paciente, tabagismo, gravidez, diabetes, cardiopatias, imunidade pré-existente, imunossupressão e patogenicidade e virulência da amostra viral. A disseminação do VI por via aerógena, através de partículas eliminadas com a tosse e espirros, contribui para a rápida propagação e aparecimento de epidemias. Ocasionalmente o contágio pode ocorrer através de fômites. Aves (domésticas, aquáticas e migratórias), suínos e eqüinos podem contribuir para a manutenção do VI em a natureza (Figura 03) (CAPUA; ALEXANDER, 2004; NICHOLSON; WOOD; AMBON, 2003; OIE, 2004).

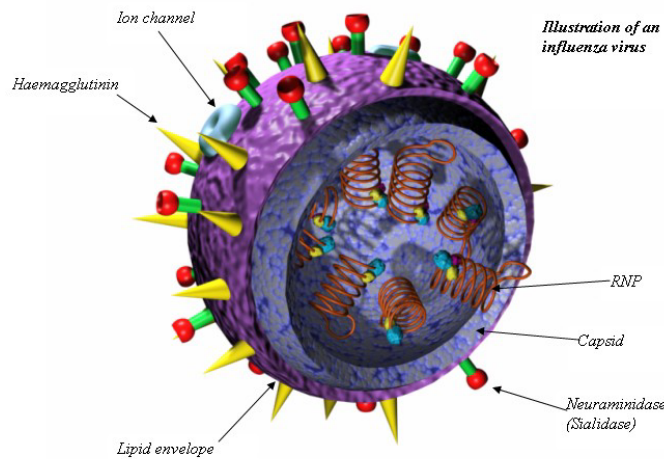


Fonte: Webster, et al. (1992).

Figura 03- Epidemiologia do vírus da Influenza mostrando diferentes hospedeiros e destacando o papel das aves como reservatório da Influenza

A eliminação do VI nas secreções nasofaríngeas pode alcançar títulos elevados, da ordem de 10^3 a 10^7 DICT_{50%}/mL secreção, já nas primeiras 24 horas, persistindo até 72 horas, declinando a partir de 96-120 horas após o aparecimento dos primeiros sintomas (NICHOLSON; WOOD; AMBON, 2003).

Os VI pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenza A*, *Influenza B* e *Influenza C*. O genoma é formado por um RNA de fita simples (ssRNA), polaridade negativa e segmentado em oito (*Influenza A e B*) ou sete (*Influenza C*) partes. O capsídeo apresenta simetria helicoidal, no qual se encontram as proteínas NP (nucleoproteína), M₁ (proteína de matriz), complexo transcriptase – PB₁, PB₂ e PA – e as não estruturais NS₁ e NS₂. O nucleocapsídeo é envolto por um envelope coberto de espículas e com três proteínas: M₂ (proteína de matriz), H (hemaglutinina) e N (neuraminidase), sendo que essa última não está presente no Influenzavirus C, que apresenta apenas duas proteínas (Figura 04). As partículas virais são bastante pleomórficas, aparecendo formas arredondadas, alongadas e filamentosas medindo cerca de 90 a 120 nm (WEBSTER et al., 1992).



Fonte: www.omedon.com.uk.

Figura 04- Representação em forma tridimensional mostrando os vários componentes do vírus da Influenza

As variações antigênicas envolvem basicamente as duas glicoproteínas externas (H e N). Até o momento são conhecidas 16 hemaglutininas e 9 neuraminidases. Essas variações podem ser dos tipos *drift* e *shift*. A variação tipo *drift* resulta em uma mutação pontual nos segmentos genômicos 4 ou 6 do ssRNA que codificam, respectivamente, H e N. A variação do tipo *shift* é mais complexa e resulta, provavelmente, de um rearranjo genético que leva à codificação de uma nova glicoproteína H ou N (CAPUA; ALEXANDER, 2004; NICHOLSON; WOOD; AMBON, 2003; OIE, 2004).

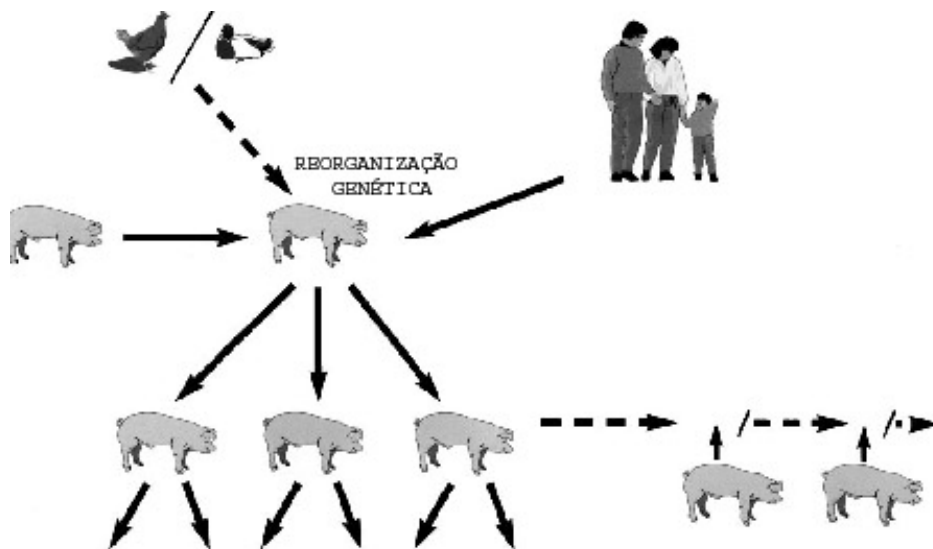
A glicoproteína H é a mais importante proteína ligada à virulência e a patogenicidade. É composta por dois segmentos: HA₁ e HA₂. O segmento HA₁ liga-se às terminações de ácido siálico presente nos receptores da célula hospedeira. O segmento HA₂ é uma região amino-terminal, conhecida como peptídeo de fusão, que forma uma espécie de “âncora” na proteína da matriz do envelope (M₂). Para o vírus tornar-se infeccioso há necessidade de clivagem da proteína precursora H (HA₀) nas subunidades HA₁ e HA₂. A clivagem ocorre por ação das proteases produzidas nas células dos hospedeiros. Essas proteases podem ser divididas em dois grupos; o

primeiro grupo inclui as chamadas “tripsina-like” presentes no trato digestivo e no trato respiratório; o segundo grupo é representado por endoproteases não-específicas, que fazem a clivagem com múltiplos resíduos básicos próximos ao sítio de clivagem da HA₀. A presença de lisina e da arginina, faz com que a interação desses aminoácidos com essas proteases permita a reduplicação viral em vários órgão ou tecidos, o que explicaria a diferença em virulência e patogenicidade das amostras (MO et al., 1997; TOLLIS; TRANI, 2002; WEBSTER et al., 1992).

A pandemia de 1918 foi causada pelo Influenza vírus tipo A subtipo H₁N₁, que circulou até 1957, quando houve o surgimento do subtipo H₂N₂; em 1968 apareceu o subtipo H₃N₂ (gripe de Hong Kong) e em 1997 houve o ressurgimento do H₁N₁ (gripe russa). Desde essa época os subtipos H₁H₁ e H₃N₂ vêm circulando na população humana, que tem sido infectada pelas hemaglutininas H₁, H₂ e H₃ e pelas neuraminidases N₁ e N₂. Os suínos têm sido infectados pelas hemaglutininas H₁ e H₃ e pelas neuraminidases N₁ e N₂. Os eqüinos pelas hemaglutininas H₃ e H₇ e pelas neuraminidases N₇ e N₈. Nas aves, teoricamente e em condições naturais é bem provável que todas as combinações de H e N já tenham ocorrido (NICHOLSON; WOOD; AMBON, 2003; OIE, 2004).

A influenza suína foi observada pela primeira vez em 1918 nos Estados Unidos da América do Norte. Em 1919 ocorreu pandemia na Hungria e na China afetando suínos e seres humanos. Estudos retrospectivos demonstraram que o agente foi o subtipo H₁N₁ e que tenha sido transmitido aos suínos pelos humanos (WEBSTER et al., 1992). A influenza suína é a doença respiratória mais comum nessa espécie animal., Surtos epidêmicos, em todo mundo, sempre aparecem associados a fatores ligados ao manejo deficiente e contaminação bacteriana ou viral secundária, principalmente no período de inverno. Os subtipos identificados tem sido o H₁N₁ e

H₃N₂. Inquérito epidemiológico no Reino Unido revelou que 14% da população suína já havia tido contato com os dois subtipos (BROWN, 2000). O suíno vem sendo incriminado por fazer o papel intermediário na reorganização genética dos VI de origem aviária e humana pelo fato de apresentar receptores de ligação do tipo α -2,3 e α -2,6 do ácido siálico galactosidase, o que permite a co-infecção de diferentes subtipos, facilitando o aparecimento de novo subtipo (Figura 05) (BROWN, 2000; CASTRUCCI et al., 1993; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUZUKI et al., 2005).



Fonte: BROWN et al. (2000).

Figura 05- Representação da reorganização genética do vírus da Influenza mostrando diferentes hospedeiros e destacando o papel do suíno como agente principal neste processo

A influenza aviária fez com que a Organização Mundial da Saúde implantasse em 1947 a Rede de Vigilância Epidemiológica da Gripe. Assim, os VI foram isolados de 90 espécies de 12 das 50 ordens de pássaros. A distribuição mundial tem sido maior em espécies aquáticas e da Ordem Anseriformes (STALLKNECHT, 1998). Desde a primeira descrição da Influenza Aviária Altamente Patogênica (IAAP, subtipo H₅N₁) em 1959 e até 1991, 17 focos primários foram detectados, sendo 12

em galinhas e cinco em perus. Até então, a transmissão parecia ser bastante limitada, todavia no México em 1994 e no Paquistão em 1995 a transmissão mostrou um comportamento de rápida e alta disseminação, causando perdas econômicas significativas devido à mortalidade e ao abate sanitário (ALEXANDER, 2000). A alta letalidade desse subtipo para seres humanos, principalmente em Hong Kong, onde seis entre 18 pessoas infectadas vieram a óbito, enfatiza o risco do aparecimento de uma nova pandemia (KURTZ; MANVELL; BANKS, 1996; PEIRIS et al., 1999; SUBBARAO et al., 1998).

Em junho de 1993 o Laboratório Nacional de Serviços Veterinários de Ames, Iowa, EUA, recebeu duas amostras de filhotes de emas com aproximadamente 30 dias de vida, proveniente do Estado do Texas e duas amostras de animais adultos, de idades desconhecidas, provenientes do Estado da Carolina do Norte para confirmação da suspeita clínica e tipificação de VI. Antes da morte as emas apresentavam os seguintes sinais clínicos: edema dos seios nasais, descarga ocular, dificuldade respiratória e tosse. Foram isolados VI e identificados como subtipos H₅N₂ e H₇N₁. Esse foi o primeiro caso de VI descrito em ratitas (PANIGRAHY; SENNE; PEARSON, 1995).

Durante o inverno de 1991, um foco de uma doença em avestruzes jovens espalhou-se rapidamente através de Litte Karoo, uma província ao Oeste da Cidade do Cabo, África do Sul. Focos similares já haviam ocorrido nos biênios de 1981/82 e 1986/87, todavia poucas propriedades haviam sido atingidas. Os principais sinais clínicos observados eram: urina com coloração esverdeada, depressão, perda de apetite, asas abertas, aerosaculite e descarga nasal., Algumas aves morriam dois a três dias após o aparecimento dos sintomas e outras se recuperavam lentamente ao final de duas a três semanas; a mortalidade era maior em propriedades que

apresentavam alta densidade populacional e piores condições de higiene, sendo que 80% da mortalidade observada foi em animais na faixa etária de até um mês, 15% em animais até oito meses e adultos não foram acometidos. À necropsia observava-se: fígado edemaciado, congesto e friável com áreas de necrose de dois a cinco mm; baço com lesões semelhantes; intestino delgado com severa congestão e conteúdo mucóide; rins edemaciados e ureteres contendo urina esverdeada; em muitos casos podia-se observar aerosaculite fibrinosa e sinusite mucóide associada à descarga ocular. O VI foi isolado em ovos embrionados de galinha com título hemaglutinante $T=256$, o resultado da sorotipificação foi o subtipo H_7N_1 e o teste de patogenicidade em galinhas demonstrou trata-se de uma amostra de baixa patogenicidade (ALLWRIGHT et al., 1993).

Durante o período de quarentena para entrada de avestruzes na Dinamarca ocorreu um foco de influenza. Em um lote de 506 avestruzes jovens, com aproximadamente 10 kg de peso vivo, que estava em observação no quarentenário, houve 45 mortes no terceiro dia; a mortalidade continuou e até o 23^o dia foram atingidas mais 146 aves. As principais lesões observadas foram: impactação do proventrículo, alterações intestinais, hepatite multifocal, aerosaculite, pneumonia focal, petéquias no pericárdio e traquéia. O VI foi isolado em ovos embrionados de galinha com títulos hemaglutinantes variando de $2 \leq T \leq 256$, o resultado da sorotipificação foi o subtipo H_5N_2 e o teste de patogenicidade em galinhas demonstrou trata-se de uma amostra de baixa patogenicidade (JORGENSEN et al., 1998).

Na Itália, em 2000, em um criatório com 172 avestruzes, sendo 30 reprodutores e 142 jovens entre sete a nove meses de idade, ocorreu morte súbita de duas aves jovens, seguida de mais 44 em poucos dias. Os sinais clínicos

apresentados foram: incoordenação motora, anorexia, depressão, urina esverdeada e fezes hemorrágicas. O exame histopatológico demonstrou necrose nos rins e fígado e no baço inflamação e necrose de vasos proeminentes. Os 30 reprodutores não apresentaram nenhum sinal clínico. A partir dos animais mortos foram isolados VI e o resultado da sorotipagem foi o subtipo H₇N₁ (CAPUA et al., 2000).

Inquérito sorológico realizado em avestruzes abatidos nos Estados de Ohio e Indiana demonstraram um animal com anticorpos para o subtipo H₅N₉. Pelo resultado obtido, os autores sugerem a realização de inquéritos sorológicos com o intuito de monitorar as criações de avestruzes e identificar possíveis portadores de VI (LEY et al., 2000).

O diagnóstico laboratorial da Influenza é efetuado por diversas técnicas como: isolamento viral em ovos embrionados de galinha, isolamento em cultura de células MDCK (célula de rim de cão), ELISA, inibição da hemaglutinação (HI), hemólise radial simples. O isolamento viral em ovos embrionados é a técnica recomendada pela OMS para diagnóstico direto e a HI a prova para detecção de anticorpos neutralizantes (ARENAS et al., 1990; DE MARCO et al., 2004; MANCINI et al., 2004; WEBSTER et al., 1992).

Estudos sobre a detecção de anticorpos ou do vírus em aves silvestres no Brasil não são comuns sendo que Anraku, Faria e Takeyama (1971) realizaram levantamento sorológico em 1.332 amostras de soros de 19 espécies de aves silvestres provenientes das diferentes estações de caça mantidas pelo Instituto Adolfo Lutz, utilizando a técnica da imunodifusão para o vírus da *Influenza A* e obtiveram animais reagentes em todas as espécies de pássaros pesquisada num total de 33 amostras de soros reagentes. Soares et al. (2005) padronizou uma técnica de duplex RT-PCR para a detecção de genes dos vírus da *Influenza A* e o

vírus da doença de Newcastle para aves migratórias. Amostras positivas (3) foram confirmadas pela técnica e 86 amostras de aves da ordem *Anatidae* (patos selvagens) obtidas do Zoológico de São Paulo foram não reagentes.

2.3 ENCEFALOMIELE E EQUINA (AMERICANA).

A encefalite eqüina americana foi descrita pela primeira vez em 1831 num surto em Massachusetts que acarretou a morte de 75 cavalos. Desde aí novos focos da doença foram descritos no Leste dos Estados Unidos da América do Norte e o vírus passou a ser denominado como Vírus da Encefalite Eqüina tipo Leste (EEEV). Em 1931, a partir do cérebro de um cavalo morto em San Joaquin Valley na Califórnia foi isolado um vírus que não era correlacionado com o EEEV e passou a ser denominado de Vírus da Encefalomielite Eqüina Oeste (WEEV). Em 1936 ocorreu um surto de encefalomielite eqüina na Venezuela e o vírus isolado não apresentava identidade antigênica com os anteriores e passou a ser chamado de Vírus da Encefalomielite Eqüina Venezuelana (VEEV) (MURPHY et al., 1999).

Os vírus das Encefalites Americanas são classificados como membros da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* e com 26 membros reconhecidos. Os membros do gênero *Alphavirus* com base em reações sorológicas foram divididos em três grandes grupos sendo: grupo VEE/EEE, grupo vírus da Floresta Semiliki, Grupo do vírus Sindbis. Existem ainda dois grupos que não se enquadram nos três grupos acima os vírus de recombinação desconhecida (WEE) e grupo de vírus ainda

não agrupados como o vírus Ndumu e o vírus Buggy Creek (CALISHER; KARABATSOS, 1988).

A principal via de transmissão é através de artrópodes (vetores biológicos), que poderão permanecer infectados durante toda a vida. A replicação do vírus nos mosquitos ainda não está bem definida, mas a infecção é benigna, pequenas alterações nas células de glândulas salivares. Após um período de incubação de três dias a duas semanas o mosquito é capaz de transmitir o vírus através da picada (HARDY, 1988; STRAUSS; STRAUSS, 1994). Participam ainda na cadeia epidemiológica as aves silvestres e os roedores (KOTAIT et al., 1992).

A maior atividade viral do vírus da EEE tem ocorrido na região Leste dos Estados Unidos da América que coincide com a distribuição do mosquito *Culiseta melanura*, vetor primário do vírus EEE (JOHNSTON; PETERS, 1996). A maior atividade viral do vírus da WEE tem ocorrido na região Oeste dos Estados Unidos da América que coincide com a distribuição do mosquito *Culex tarsalis*, vetor primário do vírus WEE (JOHNSTON; PETERS, 1996; REISEN; MONATH, 1988).

O uso de rebanho de aves sentinelas tem sido utilizado nos Estados Unidos da América para monitorar a atividade dos vírus pelas agências de controle de doenças transmitidas por artrópodes (BOWEN; FRANCY, 1980; CRANS, 1998; MOORE et al., 1993).

Os sinais clínicos observados em humanos são de dor de cabeça, meningite, pneumonia e rinite. Crianças e jovens apresentam a doença de forma mais severas que culminam com a morte (CALISHER et al., 1990). Amostras Norte americanas são consideradas mais virulentas que as amostras Sul americanas, que raramente estão associadas com casos de doença humana (SCOTT; WEAVER, 1989).

As infecções são na maioria das vezes assintomáticas ou com sinais clínicos inespecíficos tais como febre, anorexia e depressão. A evolução para doença sistêmica com sinais clínicos neurológicos evolui ao óbito, sendo que a doença neurológica é mais severa na EEE. Os sinais são aparentes após um período de incubação de cinco dias onde se observa: febre, depressão, sonolência, incoordenação motora, cabeça pendida para baixo, orelhas caídas, ranger de dentes, fotofobia, hiporeflexia, paralisia, convulsões e morte. A mortalidade varia de 50-90% de letalidade para EEE, 20-40% para WEE e 50 a 80% para VEE (MURPHY et al., 1999).

No Brasil no Vale do Ribeira no Estado de São Paulo, já foram identificados anticorpos para os vírus dos tipos Leste, Oeste e Venezuelano. O vírus do tipo Venezuelano já foi isolado em mosquitos do gênero *Culex* sp. e em uma espécie de morcego frugívoro *Carollia perspicillata*. O vírus do tipo Leste já causou grandes epizootias em eqüinos no Brasil, havendo também isolamento de vírus e identificação de anticorpos para o vírus do tipo Oeste (IVERSSON; COIMBRA, 1984; KOTAIT et al., 1992; LOPES; SACHETTA, 1974).

Nos anos de 1996 e 1997 foi descrita a presença de uma doença em eqüinos que apresentava sintomatologia compatível com a da Encefalomielite eqüina em quatro municípios do Estado do Paraná. Com o intuito de diagnosticar a doença foram efetuados levantamentos sorológicos nos animais sobreviventes das propriedades envolvidas e a colheita de artrópodes culicídeos para isolamento do vírus. Foram colhidas na região do surto, 1883 culicídeos de 25 espécies, onde não foi detectada a presença de vírus. A presença de anticorpos contra o EEEV foi detectada em 12 soros de 21 animais sobreviventes testados. Foi observada a reação cruzada para os vírus Mucambo, Pichuna, Encefalite de Saint Louis e

Maguari. A conclusão do estudo foi a de que o agente etiológico provável possa ter sido o EEEV, e sugere a necessidade de novos estudos principalmente inquéritos sorológicos em aves silvestres migratórias, aves residentes e eqüinos próximos à região do pantanal mato-grossense (FERNÁNDEZ et al., 2000).

No Estado da Geórgia, nos Estados Unidos da América, ocorreu um surto de enterite hemorrágica que afetou duas emas adultas. No exame pós-*mortem* foi observado severa enterocolite hemorrágica difusa com necrose perivascular do baço e fígado. Não foi observada a presença de encefalite ou meningite. Exames laboratoriais levaram ao isolamento, em células VERO (rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*) do EEEV. O vírus isolado foi experimentalmente inoculado em perus e avestruzes. Os animais inoculados morreram 20 horas após a inoculação, apresentando os seguintes sinais clínicos: hemorragia peritoneal, necrose intestinal com necrose do baço e fígado. Não foi observada a presença de encefalite ou meningite. O vírus foi isolado do intestino delgado, fígado e cérebro. A origem do vírus no surto descrito acima foi atribuída às aves silvestres e a transmissão através da picada de mosquitos, não sendo descartada a passagem para outros animais durante o surto pela via oro - fecal (BROWN et al., 1993).

O diagnóstico laboratorial das encefalites americanas é obtido pela inoculação das amostras suspeitas em cultura de célula (VERO) ou cérebro de camundongos lactentes, sendo os vírus isolados identificados por imunofluorescência. O teste de amplificação do ácido nucléico tem sido usado para testes de vigilância epidemiológica com a vantagem de ser sensível e uma alternativa mais rápida para os testes tradicionais (FERNÁNDEZ et al., 2000; LAMBERT ; MARTIN; LANCIOTTI 2003).

Testes sorológicos são efetuados utilizando-se técnicas como a HI, ELISA e soro neutralização em cultura de tecido, com resultados favoráveis variando entre eles os custos e o tempo de execução (CALISHER, et al., 1986; FERNÁNDEZ et al., 2000; KOTAIT et al., 1992; LAMBERT; MARTIN; LANCIOTTI 2003; OLSON et al., 1991).

2.4 LEPTOSPIROSE.

Leptospirose é uma doença infecciosa emergente exemplificada pelos grandes surtos que ocorreram na Nicarágua, Brasil, Índia, Sudeste Asiático e EUA e em diversos países como resultado da competição no EcoChallenge Sabah 2000 na Malásia (BRANDLING-BENNETT; PINHEIRO, 1996; CDC, 1998; CDC, 2000; CDC, 2006; NAKAMURA et al. 2006; TREVEJO et al., 1998; WHO, 1999).

A leptospirose normalmente é contraída pôr humanos através do contato direto ou indireto com os microrganismos eliminados na urina de animais infectados. A porta de entrada usual é através de abrasões ou cortes na pele ou conjuntivas. A infecção pode ocorrer em pele intacta desde que imersa em água por tempo prolongado como ocorre com pessoas durante as inundações (BATISTA et al., 2004).

Uma das primeiras descrições da doença há mais de 100 anos foi efetuada por Adolf Weil em Heidelberg na Alemanha em trabalhadores de esgoto, apesar de haver descrições de doenças na China antiga (febre da colheita do arroz) e Japão (febre do outono) que lembram à leptospirose (LEVETT, 2001).

As *Leptospiras* são espiroquetas com 0,1 μm a 20 μm de comprimento, mas eventualmente é possível se observar células mais longas. As extremidades podem ser curvadas formando “ganchos” bem distintos (Figura 06). A bactéria possui dois filamentos axiais (flagelo periplásmico) com inserções polares localizadas no espaço periplásmico. A estrutura das proteínas flagelares é complexa. Morfologicamente as *Leptospiras* são indistinguíveis, mas a morfologia de isolados varia de acordo com a subcultura “in vitro”, podendo ser restaurada por passagem em *Mesocricetus auratus* (hamster) (ELLIS, et al., 1983; TRUEBA; BOLIN; ZUERNER, 1992).



Fonte: www.ucmp.berkeley.edu

Figura 06 - Ilustração de uma bactéria do gênero *Leptospira* sp. mostrando aspectos morfológicos da célula bacteriana

O gênero *Leptospira* em 1989, foi dividido em duas espécies a *Leptospira interrogans* e a *Leptospira biflexa*, sendo que *Leptospira interrogans* é considerada patogênica para seres humanos e animais e a *Leptospira biflexa* é considerada saprófita. Sorovares são variantes antigênicas de *Leptospiras interrogans* ou *Leptospira biflexa* que foi determinado com base em análises sorológicas. Foram

identificados mais de 230 diferentes sorovares que estão distribuídos nos 28 sorogrupos (LEVETT, 2001).

A diferenciação entre os dois gêneros faz-se pela habilidade de apresentarem ou não crescimento a 13°C, na presença de 8-azaguanina na concentração 225 µg/mL e por não apresentarem a forma esférica em meio com concentração de 1M NaCl (JONHSON; FAINE, 1984). Os 23 sorogrupos da *Leptospira interrogans* estão distribuídos como no quadro 01.

Sorogrupo	Sorovar
Icterohaemorrhagiae,	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
Hebdomadis .	Hebdomadis, jules, Kremastos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, bratislava, lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	sejroe, saxkoebing, hardjo
Panama	panama, mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Fonte: LEVETT 2001.

Quadro 01- Sorogrupos e alguns sorovares *Leptospira. interrogans* lato senso

A classificação das espécies de *Leptospira spp.* com base no genótipo e a sua heterogenicidade genotípica foi demonstrada pela técnica de hibridização do DNA, onde em uma primeira etapa foram definidas sete genoespécies e

posteriormente ampliado o número de genoespécies (RAMADASS, et al., 1992; YASUDA, et al., 1987).

A classificação molecular das espécies de leptospira é incompatível com o sistema de sorogrupos que é utilizado pelos epidemiologistas e microbiologistas clínicos, portanto até a validação dos métodos moleculares é recomendado que os métodos sorológicos sejam mantidos (LEVETT, 2001).

A correlação entre as vias de inoculação e a instalação da infecção foi estudada em hamster. Dentre as vias de transmissão estudadas a que apresentou a menor eficácia foi à via oral, Apenas 40% dos animais inoculados por esta via tiveram a infecção confirmada. A ocorrência da infecção em 80% nos animais inoculados pela via conjuntival quando comparada com a infecção de 100%, obtida pelas demais vias (via intraperitoneal, subcutânea e escarificação cutânea) foi interpretada como consequência de mecanismos inespecíficos de defesa existentes nesta porta de entrada (MACEDO et al., 2004).

A ocorrência da doença é significativamente maior em países de clima quente do que em regiões de clima temperado e a doença apresenta comportamento sazonal, com a maior ocorrência de casos no verão ou épocas das chuvas. À presença de temperatura alta e umidade favorece a sobrevivência dos microrganismos no meio ambiente, sendo a dessecação o principal fator de limitação de sobrevivência das *Leptospiras* (BRANDLING-BENNETT; PINHEIRO, 1996; EVERARD; EVERARD, 1993).

Animais e seres humanos são divididos como hospedeiros definitivos e hospedeiros acidentais. A doença é mantida na natureza pela infecção crônica dos túbulos renais dos hospedeiros definitivos. Os hospedeiros definitivos são definidos como espécies animais que mantêm a doença de forma endêmica e geralmente a

transferem de animal para animal por contato direto. A infecção é adquirida no início da vida e a prevalência da excreção crônica das *Leptospiras* na urina aumenta com a idade (BABUDIARI, 1958¹ apud LEVETT, 2001).

Diferentes espécies de roedores podem ser reservatórios de distintos sorogrupos de *Leptospira* sp. Os ratos são normalmente reservatórios do sorogrupo Ballum. Os camundongos são os reservatórios do sorogrupo Icterohaemorrhagiae e Ballum. Os bovinos são reservatórios dos sorovares Hardjo, Pomona, e Grippotyphosa, suínos dos sorovares Pomona, Tarassovi ou Bratislava e as ovelhas dos sorovares Hardjo e Pomona. Entre os cães os sorovares Canícola e Icterohaemorrhagiae são os mais observados. A presença de diferentes sorovares nas espécies animais apresenta variações regionais importantes (BATISTA et al., 2004; LEVETT, 2001).

Três padrões epidemiológicos foram estabelecidos onde o primeiro ocorreria em regiões com clima temperado onde poucos sorovares estão envolvidos em infecções humanas decorrentes quase que invariavelmente do contato direto com animais infectados no caso criação de bovinos e suínos. O segundo padrão ocorreria em áreas tropicais, onde muitos sorovares infectariam homens e uma ampla diversidade de espécies animais incluindo roedores, animais de criação e cães. A exposição dos seres humanos não esta limitada à ocupação profissional, mas pode ser resultante da contaminação ambiental, principalmente nos períodos chuvosos. O terceiro padrão ocorreria através da infecção com origem em roedores (rodent-borne) em um ambiente urbano, sendo este o padrão menos significativo principalmente países desenvolvidos que possuem uma boa infra-estrutura urbana

¹ BABUDIARI, B. Animal reservoir of leptospirosis. **Annales New York Academy Science**, v. 70, p. 393-413, 1958.

apesar disso houve o aparecimento de focos da doença nos EUA em 1998 (CDC 1998; FAINE et al., 1994; VINETZ et al., 1996).

A infecção por espécies de *Leptospira spp.* patogênicas é uma importante causa de doença para seres humanos. A doença é caracterizada pela disseminação do agente pela corrente sanguínea afetando múltiplos órgãos incluindo: cérebro, humor aquoso, fígado, pulmão e rins. É uma zoonose com ampla distribuição ocorrendo no meio rural e urbano (GUERREIRO et al., 2001).

O quadro ictérico é o mais severo da leptospirose onde a doença na forma aguda é rápida e progressiva e culmina com alta mortalidade que varia de cinco a 15%. A forma ictérica esta presente em cinco a 10% de todos os pacientes com leptospirose. A icterícia não esta associada com a necrose hepatolobular e a função hepática retorna ao normal após a recuperação da doença (LEVETT, 2001).

As complicações apresentadas no quadro clínico da leptospirose são características de uma doença de natureza multisistêmica. A presença de: falência renal aguda, pancreatite, meningite, trombocitopenia e sintomas pulmonares são sintomas comuns. Em eqüinos e humanos a seqüela mais comum é a uveíte recorrente, que pode ser considerada uma doença autoimune (DAHER et al., 2003; HÜTTNER; PEREIRA; TANAKA, 2002; PARMA et al., 1987).

Em bovinos e suínos o quadro reprodutivo inclui abortos, retorno ao cio e infertilidade. A doença leva a perdas na produção de leite decorrente do aumento do intervalo de partos (BOQVIST et al., 2003; FAINE et al., 1999; KAZAMI et al., 2002).

O exame direto de amostras clínicas pode ser efetuado através da microscopia de campo escuro que permite a visualização das *Leptospiras spp.* Outros métodos de observação direta podem ser usados como: coloração por sais

de prata, imunofluorescência ou imunohistoquímica (BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989; UIP; AMATO NETO; DUARTE, 1992).

O método de referência para a realização de testes sorológicos é o Teste da Aglutinação Microscópica (MAT) também conhecida por Soro Aglutinação Microscópica (SAM). Neste teste ocorre a reação do soro do paciente com uma suspensão de um determinado sorovar de *Leptospira* spp. Após um período de incubação a mistura soro-antígeno é observada no microscópio de campo escuro, onde se observa para resultado reagente a formação de grumos de bactérias aglutinadas pelos anticorpos. Diversas modificações foram propostas de modo que se permitiu a realização da MAT em microplacas (COLE; SULZER; PURSELL, 1973; KAUFMANN; WEYANT, 1995).

Para a realização da MAT também faz-se necessária à manutenção em laboratório de culturas vivas que são repicadas semanalmente e de um técnico treinado para efetuar o cultivo e a leitura. A utilização da MAT para detecção da doença na fase aguda é limitada, pois o aparecimento de anticorpos aglutinantes só acontece alguns dias depois de iniciado os sintomas da doença. Para diagnóstico sorológico normalmente é efetuada a sorologia pareada onde se compara o título do paciente na fase aguda com o paciente na fase de convalescença (BRANDÃO et al., 1998; CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999).

A MAT é o teste indicado para ser usado em estudos soroepidemiológicos, podendo-se reduzir ou aumentar o número de sorogrupos a serem testados para determinada espécie. É usual adotar o parâmetro de título maior ou igual a 100, como evidência de exposição anterior a *Leptospira*. Os resultados da MAT podem dar uma idéia da distribuição sobre qual sorogrupo esta presente em uma

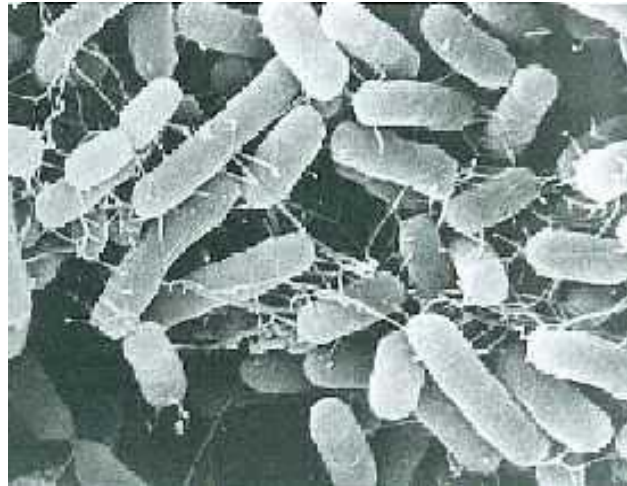
determinada população. (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; FAINE, 1999; VASCONCELLOS, 1987).

O teste da MAT foi utilizado para determinar a soroprevalência de anticorpos anti – *Leptospira* spp. em 70 animais domésticos e 54 aves e animais silvestres na Etiópia. O resultado obtido na frequência de ocorrência dos anticorpos foi de: eqüinos (91,3%), bovinos (70,7%), suínos (57,1%), caprinos (47,3%), ovinos (43,4%), camelos (15,4%) e cães (8,3%) as 54 amostras de aves e animais silvestres não foram reagentes (MOCH et al., 1975).

2.5 SALMONELOSE

A *Salmonella* é uma bactéria gram negativa, móvel pertencente à família *Enterobacteriaceae* (figura 07). O gênero *Salmonella* foi primeiro descrito em 1880 por Eberth e cultivada em 1884 por Gaffky. Amostras foram diferenciadas com base na reação sorológica com antígenos bacterianos que passou a ser reconhecido como sistema Kauffmann & White de identificação sorológica. Os antígenos foram divididos em: K (capsulares), O (somáticos), H (flagelares), este sistema foi utilizado para designar as espécies como, por exemplo: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum* e *S. dublin* (DARWIN; MULLER, 1999). Na classificação da família *Enterobacteriaceae* existe duas espécies para o gênero *Salmonella*, sendo a *Salmonella enterica* com seis subespécies e *Salmonella bongori* (MINOR; POPOFF, 1987). A *Salmonella enterica* apresenta as seguintes subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica*

subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indicae* onde as mais de 2000 espécies baseadas no sistema Kauffman & White passaram a serem denominadas como sorovares ou sorotipos (MCWHORTER-MURLIN; HICKMAN-BRENNER, 1994; POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003).



Fonte: www.pref.iwate.jp

Figura 07- Ilustração de células de bactérias do gênero *Salmonella* sp. mostrando detalhes como os flagelos e pilli

Alguns sorotipos de *Salmonella* como a *S. typhi* e *S. pullorum* tem um número de hospedeiros restritos, mas muitos sorotipos infectam grande número de animais e podem causar doença no homem. A *Salmonella* é capaz de causar uma variedade de sinais clínicos que são: febre, enterocolite e infecções focais. A enterocolite é manifestação mais comum da doença causada pela *Salmonella*, mas a bacteremia e infecções focais podem acompanhar ou suceder a enterocolite (CHIU; SU; CHU, 2004).

Em humanos a Febre tifóide é causada pela *S. typhi* e *S. paratyphi* e ocasionalmente por outros sorotipos. Quadros de enterocolite foram associados com aproximadamente 2000 sorotipos de *Salmonella*, no entanto a maioria das infecções

acontece com 10 sorotipos, entre eles os mais prevalentes são *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. heidelberg* (OLSEN; HAMMACK, 2000). O período de incubação é de 6 a 48 horas, onde o paciente apresenta dor de cabeça, dor abdominal, diarreia e vômito. A diarreia pode conter sangue e muco. Febre, mal estar e dor muscular são sinais clínicos comuns. Os sintomas geralmente desaparecem em uma semana, mas a *Salmonella* pode ser eliminada pelas fezes por semanas (DARWIN; MILLER, 1999).

A fagotipagem é um método de discriminação de *Salmonella*, especialmente para a *S. enteritidis* e é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos. Os fagos mais utilizados são PT-2, PT-4, PT-6, PT-8, PT 13a, PT-22, PT-23 (FERNANDES et al., 2003; WARD; DE SA; ROWE, 1987). O Instituto Robert Koch possui uma coleção de 209 fagotipos que são usados para vigilância epidemiológica e identificação de *Salmonellas* spp. (RABSCH; HELM; EISENSTARK, 2004).

Um fator primordial na patogenia é aderência à mucosa intestinal, sendo efetuada pelas fímbrias ou pilli. As fímbrias são geneticamente definidas em quatro grupos: fímbria do tipo 1 (Fim), fímbria codificada por plasmídeo (PE), fímbria polar longa (LP) e a fímbria agregativa (curli). As fímbrias têm especificidade para determinados tipos de células de determinadas espécies animais (BAÜMLER et al., 1996, BAÜMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996a).

A fímbria tipo 1 é morfológicamente similar, mas antígenicamente distinta da fímbria tipo 1 da *Escherichia coli*, sendo definida como um peritríquio com sete ηm de comprimento por 0,2 a dois ηm de largura. Estas fímbrias se ligam especialmente a receptores D-manose das células eucarióticas, que foi demonstrado pela diminuição da adesão às células pela adição de D-manose as bactérias antes da infecção de células “in vitro” (DUNCAN et al., 2005; SPRING et al., 2000). A exemplo

da D-manose a frutose também teve efeito inibidor da adesão bacteriana (SPRING et al., 2000).

As fímbrias LP fazem a adesão mediada da *Salmonella* às células das placas de Peyer. Utilizando o intestino delgado de camundongo como modelo “in vitro” para o estudo da infecção de *Salmonella* e fímbrias LP com e sem mutação observou-se que as fímbrias LP alteradas levavam a colonização de enterócitos e não colonizavam as placas de Peyer. As fímbrias LP normais colonizaram as placas de Peyer (BAÜMLER; TSOLIS; HEFFRON, 1996b).

As bactérias que possuem as fímbrias agregativas tendem a se auto agregar. Este fenômeno leva a bactéria a um aumento da sobrevivência frente a barreiras hostis como pH ácido do estômago e outros biocidas. Outra hipótese sugere que as fímbrias agregativas estão envolvidas na adesão da bactéria a célula hospedeira, mas a forma como isto acontece ainda não esta esclarecida (COLLINSON et al., 1991; COLLISON et al., 1993).

A *Salmonella* invade a mucosa intestinal através das células da placa de Peyer, entretanto a bactéria foi encontrada no interior de enterócitos não fagocíticos. O mecanismo de invasão consiste em estimular a célula não fagocítica a fazer a internalização da bactéria. Pelo menos 3 proteínas conhecidas participam de uma estrutura molecular que permite a abertura da membrana citoplasmática para meio externo. A observação desta estrutura na microscopia eletrônica lembra uma seringa. Esta seringa secretaria proteínas que provocariam uma reorganização do citoesqueleto celular de células eucarióticas provocando dobras para o englobamento da bactéria pela célula (DARWIN; MILLER, 1999).

A patogenicidade de diversos sorotipos de *Salmonella* foi determinada em aves com o seguinte resultado: mortalidade para *S. pullorum* (66,66%), *S.*

typhimurium (33,33%) e *S. heidelberg* (12,5% e 8,3%). Os achados necroscópicos foram: peritonite, perihepatite, pericardite, infecção do saco da gema do ovo, pneumonia e enterite (ROY et al., 2001). A patogenicidade de *S. enteritidis* fagotipos 4, 8 e 23 foi observada em frangos de corte com presença de vários graus de inflamação fibrino supurativa do epicárdio se estendendo até o miocárdio, necrose coagulativa multifocal de hepatócitos com infiltração heterofílica, perihepatite, inflamação periportal, inflamação fibrino supurativa do saco da gema, peritonite enterite (DHILON et al., 1999, DHILON et al., 2001).

Um levantamento epidemiológico realizado em aves oriundas de vários Estados do Brasil, compreendendo o período histórico de 1962 a 1991, demonstrou que os Estados de Minas Gerais e Santa Catarina obtiveram os maiores índices de isolamentos de *Salmonella*. Os sorovares *gallinarum*, *pullorum*, *typhimurium*, *heidelberg* e *enteritidis* foram os sorovares mais prevalentes (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

O isolamento de oito sorotipos de *Salmonella* em fezes de aves experimentalmente infectadas foi testado utilizando-se os meios de enriquecimento de tetrionato, Rappaport – Vassialidis e caldo selenito-cistina. Para o plaqueamento foram testados os meios de: MacConkey (MC), ágar Hektoen (HE), Salmonella-Shigella ágar (SS), ágar verde-brilhante e ágar lisina xilose desoxicolato (XLD). O caldo tetrionato apresentou resultado favorável com diferença estatisticamente significativa sobre os demais meios de enriquecimento. Os meios utilizados para o plaqueamento não apresentaram diferença estatística na sua utilização (NASCIMENTO et al., 2000).

Cadman et al. (1994) realizou um levantamento sorológico para *Salmonella enteritidis* através de ELISA em 149 avestruzes de nove criadouros no Zimbábue.

Encontrou 3 propriedades com animais não reagentes, 3 propriedades com 5 a 7% de animais reagentes, 2 propriedades com 20 e 25% de animais reagentes e uma propriedade com 60% dos animais reagentes. Ley et al. (2000) em um levantamento sorológico em 163 avestruzes em idade de abate (10 a 12 meses) utilizando a técnica de aglutinação rápida em placa para *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum* e *Salmonella typhimurium* nos Estados de Ohio e Indiana EUA. obteve 100% de animais não reagentes.

Medeiros (2002) realizou o levantamento da microflora intestinal de avestruzes abatidas no interior do Estado de São Paulo e observou a presença de uma flora bacteriana bastante heterogênea, onde foram isoladas seis amostras de *Salmonella* spp. e a bactéria *Escherichia coli* foi a espécie bacteriana com maior ocorrência.

Avestruzes submetidas à necrópsia no Laboratório de Ornitopatologia da Universidade Estadual Paulista-Campus de Jaboticabal, apresentaram na avaliação da microflora intestinal a presença de seis amostras de *Salmonella* spp. sendo que o predomínio dos isolados foram de bactérias saprófitas normais de uma microflora intestinal (MARINHO; MEIRELES; SOUZA, 2004).

O Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) do município de Campinas Estado de São Paulo é responsável pela análise microbiológica e a detecção de *Salmonella* spp em ovos e avestruzes importados no período de quarentena. No período de novembro de 1999 a setembro de 2002 foram analisadas 91 amostras (15 ovos e 76 aves) provenientes de três países, onde se detectou 31 amostras de *Salmonella* spp. (RIBEIRO et al., 2005).

Programas de erradicação da *Salmonella enteritidis* na Holanda e medidas profiláticas como padronização de boas práticas de higiene, busca de lotes

infectados através de isolamento bacteriológico e testes sorológicos foram implantadas. Como métodos alternativos ao abate dos lotes positivos medidas como tratamento com enrofloxacina e competição exclusiva com flora microbiota (probióticos) foram usadas com bons resultados (EDEL, 1994).

2.6 MICOPLASMA

As bactérias do gênero *Mycoplasma* pertencem à classe dos *Mollicutes* e uma característica peculiar é a total ausência de parede celular, sendo envolvido apenas por uma fina membrana citoplasmática trilaminar. São considerados os menores microrganismos de vida livre, com capacidade de auto-replicação. Apresentam acentuado pleomorfismo, podendo apresentar as formas esférica, bacilar, filamentosa ou helicoidal., O microrganismo é constituído essencialmente de três organelas: a membrana celular, ribossomos e a molécula de DNA circular (BRADBURY, 2005).

A evolução dos *Mollicutes* aconteceu a aproximadamente 600 milhões de anos atrás quando uma bactéria gram positiva perdeu alguns genes não essenciais, incluindo aquele que envolvia a síntese da parede celular (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Os *Mollicutes* são membros da ordem *Mycoplasmatales* sendo reconhecidos seis gêneros: *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, e *Ureaplasma*. Somente os membros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são importantes em Medicina Veterinária. Os membros dos mollicutes infectam uma

grande variedade de espécies animais. As infecções variam de assintomáticas até gravemente debilitantes e algumas vezes doenças fatais. As infecções incluem manifestações clínicas dos sistemas: respiratório, urogenital e articular podendo, ainda, provocar mastite e septicemia. A patogenicidade esta intimamente ligada à especificidade com o hospedeiro (WALKER, 2003).

O genoma dos *Mollicutes* é muito menor que as demais bactérias, sendo o genoma do *Mycoplasma genitalium* o primeiro genoma bacteriano totalmente seqüenciado seguido do *Mycoplasma gallisepticum*. O genoma das espécies *Mycoplasma* e *Ureaplasma* variam de 500 megadaltons (MDa) ou de 600 a 1.350 pares de quilobases (PAPAZISI et al., 2003).

Os *Mycoplasmas* são importantes patógenos aviários responsáveis por doenças respiratórias e articulares, acarretando grandes perdas econômicas na avicultura mundial e Brasileira. A micoplasmose foi primeiramente citada por Dodd na Inglaterra em 1905 e já foram isoladas 20 espécies de *Mycoplasmas* em aves. Os principais agentes patogênicos para galinhas e perus são *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagrides* (MM) e *M. iowae* (MI) que acarretam perdas econômicas devido ao decréscimo no crescimento e no ganho de peso, perdas por condenações de carcaças devido a doença crônica respiratória e custos com profilaxia e uso de drogas terapêuticas (MOHAMMED; CARPENTER; YAMAMOTO, 1987).

Diversas espécies de micoplasmas dependem da adesão ao tecido hospedeiro para colonizarem e infectarem células, geralmente células epiteliais. A adesão é considerada como o maior fator de virulência, sendo que amostras mutantes deficientes em aderência são avirulentas (RAZIN; JACOBS, 1992).

A estrutura localizada na extremidade terminal da célula do micoplasma denominada “*bleb*” ou “*tip*” tem função na ligação deste com a célula hospedeira, bem como na sua motilidade por deslizamento. Nesta estrutura estão localizadas as proteínas chamadas de adesinas ou proteínas P1, P30, P40, P90, HMW1, HMW2 e HMW3. (BALISH; KRAUSE, 2002).

Em 1989 foi descoberta a capacidade do *Mycoplasma penetrans* de penetrar células humanas, que abriu novas perspectivas para o conhecimento das estratégias empregadas por estes microrganismos para sobreviver e persistir em hospedeiros imunocompetentes. O espaço intracelular é fornecedor de nutrientes essenciais, proteção contra o sistema imune e resistência à ação de antibióticos (LO et al., 1993). A capacidade de invasão está associada à presença da formação de microtúbulos e microfilamentos como demonstrado pelo MG em células HeLa (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000).

A presença de vesículas repletas de *Mycoplasma penetrans* em células infectadas pode ser um indicativo da ocorrência de multiplicação no interior da célula hospedeira, mas esta multiplicação ainda não está esclarecida (LO et al., 1993).

A fusão celular é outro mecanismo que estes microrganismos utilizam, sendo que o contato íntimo e direto da membrana do micoplasma com a membrana citoplasmática da célula hospedeira permite esta fusão, mas a fusão é dependente do conteúdo de colesterol da membrana, sendo que a atividade fusogênica só foi demonstrada em espécies que requerem o colesterol para o seu crescimento (TARSHIS; SALMAN; ROTTEN, 1993). A adesão de micoplasma na membrana citoplasmática de células hospedeiras pode interferir com o mecanismo normal de transporte da célula através da membrana, já que esta é a única via de contato da célula com o meio exterior (LAMBERT et al., 1998).

O MG tem demonstrado a capacidade de secretar peróxido de hidrogênio, que impõe a célula estresse oxidativo na membrana celular. Os micoplasma possuem uma bateria de potentes enzimas hidrolíticas incluindo fosforilases, proteases e nucleases que interferem com a função normal da célula hospedeira (ROTTEM, 2002).

Para o diagnóstico laboratorial das infecções por micoplasmas o isolamento é uma opção e o material de colheita deve ser fragmento de tecidos lesados, exsudato sinovial, suabes ou lavado traqueal, sacos aéreos, exsudato de seios nasais, imersos em meio de Frey líquido (NASCIMENTO, 2000). Os micoplasmas isolados devem ser submetidos às provas de identificação, inicialmente pela observação da fermentação da glicose, hidrólise da arginina e fosfatase, testes bioquímicos como o teste de Dienes (micoplasma se coram de azul e bactérias com forma L permanecem incolores), prova da digiotonina (verifica a dependência de colesterol) e finalmente submetido a provas sorológicas (KLEVEN; YODER, 1989).

A avaliação das técnicas de cultivo bacteriológico, aglutinação rápida em placa (RPA), inibição da hemaglutinação (HI) Ensaio imuno enzimático (ELISA) e Reação em cadeia da polimerase (PCR), demonstrou que o cultivo bacteriológico e PCR detectaram animais positivos infectados artificialmente e animais negativos de forma eficiente. Os testes sorológicos apresentaram como era esperado a presença de reações falso-positivas o que reforça a recomendação que na aplicação de um programa epidemiológico para identificação de animais reagentes, o ideal é não confiar em único sistema de teste (FEBERWEE et al., 2005).

Cadman et al. (1994) realizaram um levantamento sorológico para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* através da técnica de ELISA em 149 avestruzes de nove criadouros no Zimbabwe foram encontradas 4 propriedades

com animais não reagentes e 5 propriedades com freqüência de ocorrência de 5 a 60% de animais reagentes. Ley et al. (2000) realizou um levantamento sorológico em 163 avestruzes com faixa etária de 10 a 12 meses, nos Estados de Ohio e Indiana E.U.A. utilizando a técnica de aglutinação rápida em placa para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* e obteve 100% de animais não reagentes.

Um levantamento soroepidemiológico foi efetuado em Uberlândia, MG, em 160 galinhas “caipiras” com o intuito de se observar a ocorrência de anticorpos anti – *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* utilizando-se a técnica da soroaglutinação rápida. O resultado obtido demonstrou 63,8% de soros reagentes, indicando que a manutenção destes tipos de animais em propriedades rurais pode ser importante foco de *Mycoplasmas gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* (PEREIRA, 2005).

3 OBJETIVOS

GERAL

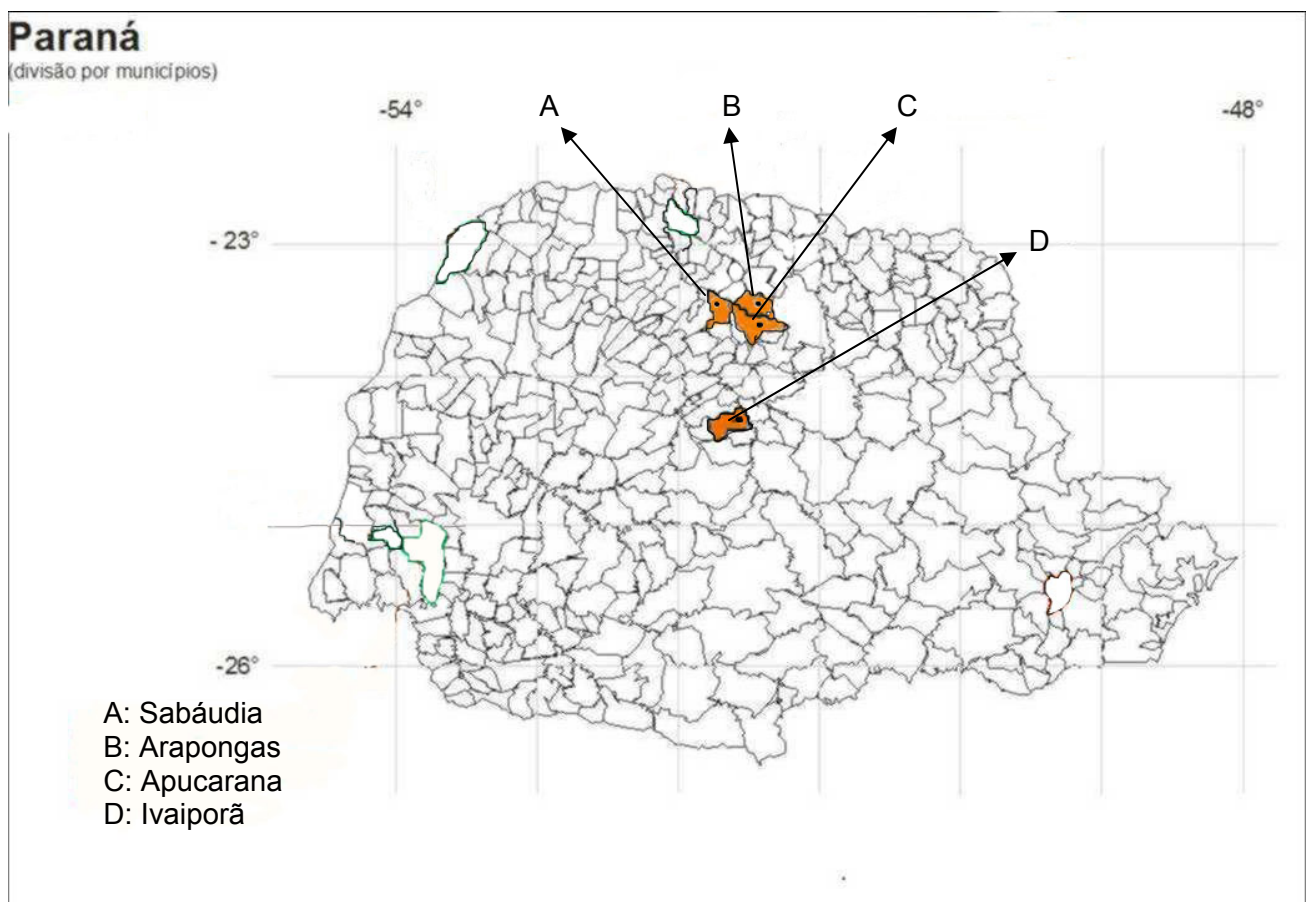
- Pesquisar a presença de agentes ou de anticorpos específicos de enfermidades com potencial zoonótico em avestruzes de criação comercial no Estado do Paraná.

ESPECÍFICOS:

- Detectar a presença de rotavírus a partir de material fecal de filhotes.
- Detectar a presença de anticorpos contra rotavírus, encefalomielite equina leste e oeste, influenza A , leptospira, salmonela e micoplasma a partir de amostras de soro de reprodutores.
- Isolar *Salmonella sp.* em animais positivos à sorologia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de soros e fezes foram colhidas em 9 propriedades nos municípios de Apucarana, Arapongas, Ivaiporã e Sabáudia no Norte do Paraná (Quadro 02).



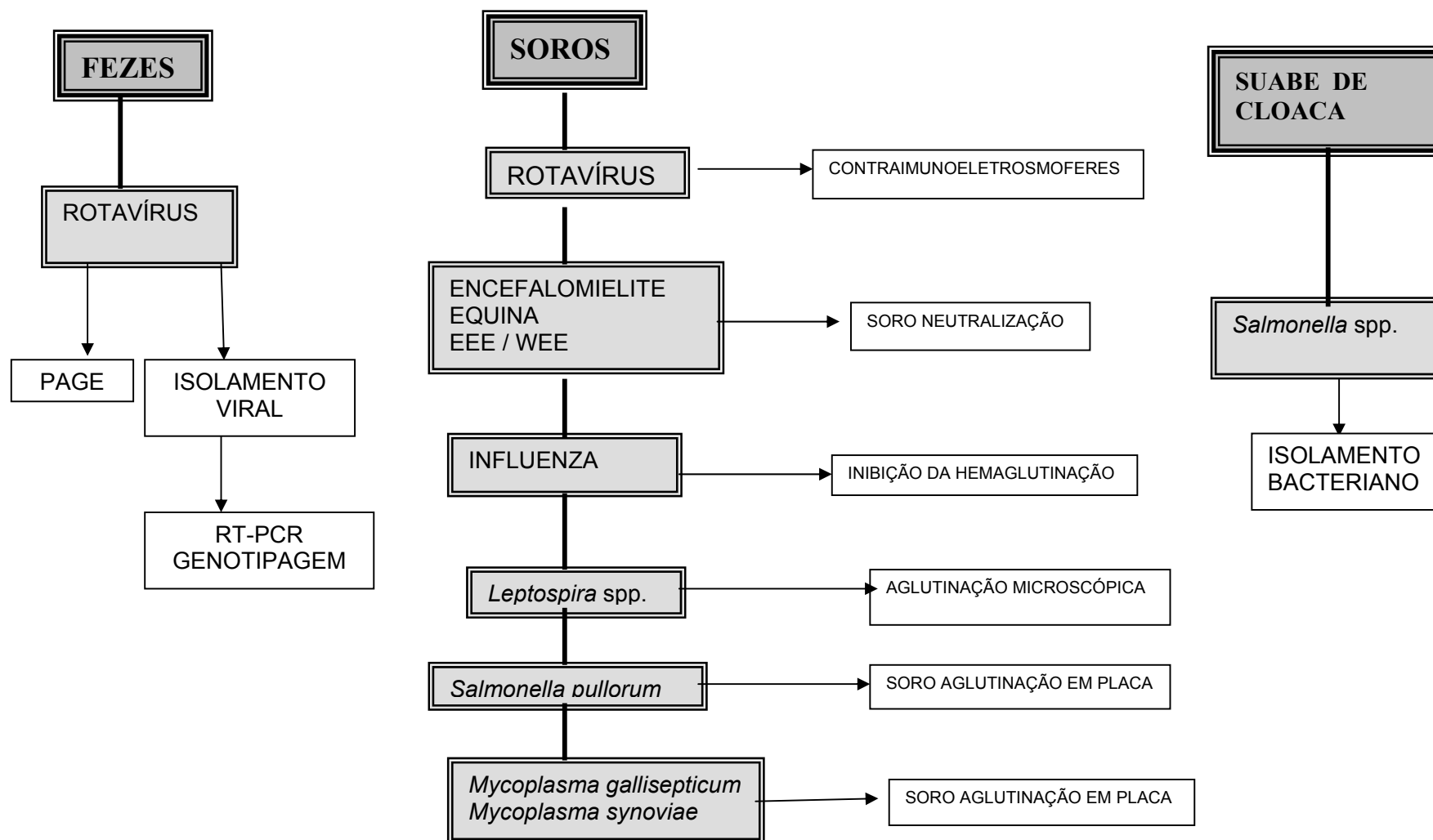
Fonte: www.Paraná.gov.br

Quadro 2-Municípios do Estado do Paraná nos quais se localizam as propriedades de criação de avestruzes estudadas

As propriedades apresentam área física de 360 a 120 mil metros quadrados sendo que a criação de avestruz não é a única atividade nestas propriedades, havendo criação de bovinos, ovinos e produção de milho e soja. A raça de

avestruzes criada em todas as propriedades é a African Black, de porte menor e mais dócil, sendo que o número de reprodutores por propriedade varia de 10 a 100.

Foram colhidas fezes de filhotes, amostras de soro sanguíneo, e suabes da região cloacal para aplicação segundo o Esquema 01.



Esquema 01- Esquema ilustrativo da sequência utilizada para a pesquisa de agentes em fezes de filhotes e de anticorpos com os soros sanguíneos e suabes de cloaca dos reprodutores

4.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de fezes, de soro e de suabe de cloaca.

4.1.1 Colheita de Fezes

Foram colhidas amostras de fezes de avestruzes, com e sem sinais clínicos de diarreia na faixa etária de um a seis meses de idade obtidas em uma das propriedades. A mesma apresenta a peculiaridade de ser o incubatório utilizado por produtores vizinhos, ocorrendo à criação de filhotes de forma concentrada nesta propriedade. Os filhotes são aí mantidos até a idade de três meses, quando são transferidos à propriedade de origem. Durante os meses de janeiro a novembro de 2003 foram colhidas 66 amostras de fezes; as mesmas foram colhidas diretamente do chão do galpão de criação, imediatamente após a defecação, sendo acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, transportadas ao laboratório sob refrigeração e congeladas a -18°C até o momento da realização do teste.

4.1.2 Colheita de Soros

Os soros de 182 reprodutores foram colhidos nos meses de janeiro a maio de 2002, 2003 e 2004. A obtenção de soro foi através da punção da veia braquial com agulha hipodérmica G-21 e de tubos estéreis a vácuo (Vacuntainer ®) com capacidade para 10 mL. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente durante 2 horas e posteriormente a 4°C até a retração do coágulo, após o que foram centrifugados a 1200 G por 15 minutos. A fração sérica obtida foi aliquoteada em amostras de 100 µL em tubos para microcentrifuga de 500 µL, permanecendo congeladas até o momento do uso.

4.1.3 Colheita de Suabes de Cloaca

Entre junho e julho de 2005 foram colhidos 100 suabes de cloaca de reprodutores para isolamento bacteriológico de *Salmonella spp.* Os suabes foram preparados em tubos de ensaio de modo a ficarem embebidos em caldo tetrionato (CT) e transportados sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

4.2 PESQUISA DE ROTAVÍRUS

Nas amostras de fezes dos filhotes (item 4.1.1) foi pesquisada a presença de rotavírus utilizando PAGE, isolamento viral em cultura de células e genotipagem.

4.2.1 Amostra Padrão

Amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Vírus), mantida no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, através de passagens sucessivas em monocamadas de células da linhagem MA₁₀₄.

4.2.2 Cultura de Células

Células da linhagem MA₁₀₄ mantidas em monocamadas através de cultivos sucessivos em meio mínimo de Eagle (MEM, Cultilab®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®)

4.2.3 Oligonucleotídeos Iniciadores (“primers”)

Foram utilizados “primers” direcionados para a sequência genômica dos antígenos VP7 [G] e VP4 [P] mais prevalentes em animais.

4.2.3.1 Genótipo G

As sequências genômicas relativas a posição 5'→3' dos primers utilizados estão ilustradas no quadro 03.

Primer	Seqüência (5'→3')	Genótipo	Posição
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	---	1-28
End9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	---	1062-1036
End9UK	GGTCACATCATACAACTCTAATCT	---	1062-1042
End9CRW8	GGTCACATCTAACAGCTTTAACCT	---	1062-1042
sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC	---	1-21
FT5	CATGTACTIONCGTTGTTACGTC	5	779-760
DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	6	499-481
HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	8	273-256
ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	10	714-697
BT11	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	11	336-316

Quadro 03- Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados para a genotipagem de rotavírus direcionados para o gene codificador da proteína VP7 (genótipo G)

4.2.3.2 Genótipo P

As sequências genômicas relativas a posição 5'→3' dos primers utilizados estão ilustradas no Quadro 04.

Primer	Seqüência (5'→3')	Genótipo	Posição
Con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	---	11-32
Con2	ATTCGGACCATTATAACC	---	868-887
pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	1	269-289
pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	5	336-354
pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	7	389-412
pGOTT	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	6	465-487
pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	11	574-594

Quadro 04- Oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados para a genotipagem de rotavírus direcionados para o gene codificador da proteína VP4 (genótipo P)

4.2.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Foi realizada a pesquisa de rotavírus nas fezes seguindo-se as recomendações de Herring et al. (1982) com algumas modificações.

4.2.4.1 Diluição das Amostras Fecais

Cada amostra fecal (item 4.1.1) foi preparada em suspensão 20% em tampão (TRIS/HCl 0,1M, CaCl₂ 1,5mM pH 7.3), em seguida submetida ao processo de centrifugação a 11.400 G por 30 minutos; o sobrenadante foi recolhido.

4.2.4.2 Extração do RNA Viral

Foi transferido 0,4 mL do sobrenadante para cada tubo plástico de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 40 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10% e a mistura foi incubada 37°C por 30 minutos em banho-maria. A seguir, adicionou-se a cada tubo 0,2 mL de fenol destilado e 0,2 mL de clorofórmio, sendo os tubos mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos, com agitação a cada cinco minutos, em mixer. A seguir, os tubos foram centrifugados a 1030 G durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos plásticos com tampa, contendo 40 µL de NaCl a 20%; adicionou-se a cada tubo 1 mL de etanol e a mistura foi incubada a -20°C por 18 horas. Decorrido esse período de tempo, procedeu-se uma centrifugação de 25000 G durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram invertidos sobre papel filtro para completo esgotamento de todo o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 15 µL de dissociador de RNA (Anexo 9.1) e incubado por 30 minutos em banho-maria a 37°. Após esta etapa, o

conteúdo de cada tubo foi distribuído em uma das canaletas do gel de poliacrilamida.

4.2.4.3 Preparo do Gel de Poliacrilamida

O gel de 1 mm de espessura foi polimerizado entre duas placas de vidro, com auxílio de espaçadores colocados entre elas, nos lados e na parte inferior. As placas foram presas uma contra a outra com garra metálica forte, sendo uma posicionada no meio de cada um dos lados e duas na parte inferior. Os bordos externos e os espaçadores foram lacrados com ágar 2% (fundido) e as placas presas foram colocadas em posição vertical sobre uma superfície plana.

A solução de gel de separação a 7,5%, preparada de conformidade com o (Anexo 9.1), foi colocada entre as duas placas de vidro. Acima dela, colocou-se uma camada de água deionizada, após a polimerização do gel de separação (aproximadamente 20 a 30 minutos), descartou-se a água deionizada, enxugou-se o topo do gel com um papel toalha e a placa foi completada com a solução do gel de empilhamento 3,5% (Anexo 9.1).

Um pente foi introduzido na solução de gel de empilhamento antes de sua polimerização. Durante a polimerização o pente forma 10 canaletas (ou poços), onde foram aplicadas as amostras.

Após a polimerização do gel de empilhamento, o espaçador inferior foi removido e as placas, com o gel de poliacrilamida no seu interior, foram fixadas em uma cuba de eletroforese do tipo vertical.

O reservatório inferior e o superior da cuba foram preenchidos com o tampão de corrida (Anexo 9.1) e o pente foi cuidadosamente removido do gel de empilhamento, deixando as canaletas livres para se adicionar as amostras.

4.2.4.4 Corrida Eletroforética

As amostras preparadas no item 4.2.4.2, foram aplicadas nas canaletas, com o auxílio de um micropipetador e ponteira; a primeira canaleta à esquerda sempre recebia a amostra padrão NCDV, que servia como controle positivo; as demais canaletas recebiam as amostras a serem testadas.

Terminada a distribuição das amostras, os eletrodos da fonte de energia elétrica foram conectados a cuba e a corrida eletroforética foi realizada a 12 mA por aproximadamente 02 horas (30 minutos após o azul de bromofenol ou corante traçador ter atingido o final do gel de separação).

Após a corrida, o gel de separação foi removido das placas para um recipiente plástico e corado com nitrato de prata.

4.2.4.5 Coloração do Gel

Após duas lavagens do gel com água deionizada, adiciona-se a solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5%); o gel ficou mergulhado nesta solução, sob

agitação suave em agitador do tipo Kleine, por 30 minutos; decorrido esse tempo, a solução fixadora foi removida e foi adicionada uma solução de nitrato de prata 0,011 M e o gel ficou mergulhado nessa solução nas mesmas condições anteriores por 60 minutos; a solução foi removida e o gel foi lavado por três vezes com água deionizada, para remover o resíduo de nitrato de prata; foi, então, adicionada a solução reveladora (Anexo 9.1). Controla-se, sob agitação manual, o tempo de aparecimento das bandas relativas aos segmentos de RNA, evitando-se o escurecimento acentuado do gel, removendo-se a solução reveladora e adicionando-se uma solução de ácido acético 5% (solução “stop”) por aproximadamente 15 minutos; remove-se a solução “stop”, lava-se o gel duas a três vezes com água deionizada e acrescenta-se uma solução de etanol 10% para a conservação do gel por alguns dias. A leitura do gel foi feita em transiluminador, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram padrão de migração eletroforética compatível com a amostra padrão NCDV. Os resultados mais importantes foram registrados fotograficamente.

4.2.5 Isolamento de Rotavírus

As amostras positivas em PAGE foram inoculadas em culturas de células da linhagem MA₁₀₄.

4.2.5.1 Tratamento das Fezes

O sobrenadante das amostras fecais preparadas de conformidade com o 4.2.4.1 foi filtrado em sistema Millex® de porosidade 0,22 µm. O líquido filtrado (item 4.2.5.1) foi tratado com solução ativadora viral (VAS) (Anexo 9.4) na proporção volumétrica de 10/1, por 30 minutos em banho-maria 37°C.

4.2.5.2 Inoculação em monocamadas

Células da linhagem MA₁₀₄ com 48 horas de crescimento tiveram o meio dispensado, a monocamada lavada duas vezes com MEM e adicionada o material fecal filtrado e tratado com VAS. Após a adsorção por 1 hora a 37°C e com agitações periódicas, foi adicionado MEM com 5µg tripsina/mL de meio.

As monocamadas foram observadas em microscópio óptico invertido para acompanhamento quanto ao aparecimento de efeito citopático, tal como observado na amostra padrão NCDV, utilizada como controle positivo. Como controle negativo foi usado inoculação de monocamadas com MEM e VAS.

Foram consideradas positivas as amostras que até a partir da terceira passagem apresentaram efeito citopático compatível para rotavírus, tal como o verificado na amostra NCDV.

4.2.6 Reação de RT-PCR / Genotipagem

Para a genotipagem das amostras positivas foram utilizadas metodologias de RT-PCR, descritas por Timenetsky, Santos e Gouvea (1994), com modificações nas etapas de extração do ácido nucleico viral, fazendo-se substituir o tratamento da amostra com isotiocianato de guanidina, hidroxiapatita e brometo de cetiltrimetilamônio pelo reagente Trizol[®] (Invitrogen[™]) e nas etapas de transcrição reversa e primeira amplificação, utilizando-se reações distintas ao invés de uma única. As amostras foram testadas com diferentes conjuntos de primers dirigidos a sequência de nucleotídeos correspondentes aos genótipos G e P mais comumente encontrados em animais (item 4.2.3). Foram refeitas as reações em que se observou a amplificação de segmentos para dois ou mais genótipos mediante o emprego de primer único, com o intuito de confirmar os achados. A água empregada em todas as reações e diluições foi obtida em equipamento Milli Q[®] e autoclavada a 127°C por 1 hora, antes do seu emprego.

4.2.6.1 Extração de RNA para Reação de Transcrição Reversa

Preparar suspensões das amostras fecais item 4.1.1 a 10% (p/v) em PBS 0,01M pH 7,4 e posteriormente clarificar por centrifugação a 2000 G por 15 minutos a 4°C. Homogeneizar 750µL de Trizol[®] e 250µL de suspensão de amostra e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Adicionar 200µL de clorofórmio e homogeneizar em vórtex e incubar por 15 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Centrifugar a 12000 G

por 15 minutos a 4°C e transferir a fase aquosa para outro tubo. Adicionar 500µL de álcool isopropílico e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Centrifugar a 12000 G por 15 minutos a 4°C e desprezar o sobrenadante. Adicionar 1 mL etanol 75% (v/v em água). Homogeneizar em agitador de tubos tipo “vórtex” e centrifugar a 7500 G por 5 minutos a 4°C. Secar o sedimento mantendo o tubo a 95°C e adicionar 50µL de água tratada com DEPC (Invitrogen™). Incubar o tubo a 56°C por 10 minutos. Conservar a -20°C até o momento do uso.

4.2.6.2 Reação de Transcrição Reversa

Misturar 5,6µL da amostra de RNA extraído no item anterior com 1,4µL de DMSO (Dimetil sulfóxido); desnaturar a 97°C por 5 minutos; em seguida, transferir para banho de gelo, permanecendo neste por mais 5 minutos. Adicionar a mistura RNA-DMSO (7µL) à solução “RT-mix”, que por sua vez é composta por 1x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 pmol/µL de cada primer (Con2 e Con3, para a genotipagem P; Beg9, End9, End9UK, e End9CRW8, para a genotipagem G) e 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para um volume final de reação de 20µL; manter a 42°C por 1 hora.

4.2.6.3 Primeira Amplificação

Misturar 5 μ L do produto obtido (item 4.2.6.2) à solução “PCR-mix”, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μ L de cada primer (Con2 e Con3, para a genotipagem P; Beg9, End9, End9UK, e End9CRW8, para a genotipagem G), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), água q.s.p. 50 μ L; submeter a 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 42°C/2 minutos, 72°C/1minuto, seguido de 72°C/10 minutos para extensão final.,

4.2.6.4 Segunda amplificação

Misturar 5 μ L de DNA amplificado na etapa anterior (item 4.2.6.3) à solução “PCR-mix”, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μ L de cada primer (Con2, pUK, pNCDV, pGOTT, pB223, e pOSU para a genotipagem P; sBeg9, FT5, ET10, DT6, BT11, e HT8 para genotipagem G), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), água q.s.p. 50 μ L, e submeter a 25 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/2 minutos, 72°C/1 minuto (para genotipagem G e P “animal”), seguindo-se um passo final de 72°C/10 minutos para extensão final.,

Em seguida, 10 μ L do produto oriundo da 2ª amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0, fazendo-se corar o gel em solução aquosa com 0,5 μ g/mL de

brometo de etídio por 10 minutos. A leitura foi feita em transiluminador com luz ultravioleta (comprimento de onda 300 nm). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram no gel segmentos amplificados de tamanho correspondente àqueles descritos (item 4.2.3), tendo como referência a inclusão de 10µL de DNA ladder 100pb (Invitrogen™) e utilizando-se como controles positivos as amostras NCDV, UK, KK3, SA11 e como negativo a água empregada em diversas etapas das reações.

4.3 PESQUISA DE ANTICORPOS

Nas amostras de soros sanguíneos dos reprodutores (item 4.1.2) foi realizada a detecção de anticorpos anti-rotavírus, anti-influenza, anti-encefalomielite equina, anti-leptospiras, anti-salmonela e anti-micoplasma.

4.3.1 Pesquisa de Anticorpos Anti-Rotavírus

Efetuada em conformidade com a metodologia preconizada por Brandão et al. (2002).

4.3.1.1 Produção do antígeno

Amostra NCDV foi cultivada em células MA₁₀₄, em um volume de 200 mL. O líquido sobrenadante foi centrifugado a 2000 G por 15 minutos a 4° C para retirada dos debrídos celulares. Foi efetuada a ultracentrifugação do líquido em gradiente de sacarose a 45% a 100.000 G por 3 horas a 4° C. O “pellet” formado foi ressuspendido em tampão TRIS 10mM/CaCl₂ 1,5 mM pH 7,3. O volume final de antígeno concentrado e parcialmente purificado foi de 4,0 mL. Após a concentração foi efetuado a PAGE do antígeno para a observação de perfil eletroferótipo compatível com NCDV. A diluição ótima foi realizada frente a prova de contraimunoeletrosmoforese frente a soro hiperimune anti NCDV preparado em coelhos no Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo.

4.3.1.2 Contraimunoeletrosmoforese (CIEOF).

Lâminas de vidro 5x7cm foram recobertas por ágar a 2 % e deixadas secar em estufa ventilada até a formação de uma película. Foi preparada agarose a 1% (Anexo 9.3) e distribuídos 6 mL em cada lâmina; após a solidificação foi efetuada a perfuração de poços de 3 mm de diâmetro e com 3 mm de distância entre os fossos.

Nos fossos foram aplicados em sentidos opostos 10 µl de antígeno e 10µl de soro do animal a ser testado.

A ponte entre a lâmina e o tampão foi obtida com auxílio de papel filtro umedecido no tampão de corrida (Anexo 9.3); foi aplicada corrente elétrica de 12 mÅ pelo tempo de 1 hora. Decorrido este tempo a lâmina foi observada com auxílio de um fundo escuro, para observação da presença de uma linha de precipitação entre o antígeno e o soro. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a linha de precipitação semelhante a observada no soro padrão (controle positivo).

Para cada lâmina testada foi adicionado às duas extremidades soro padrão anti-rotavírus como controle positivo

Os soros positivos foram testados posteriormente com uma solução de células MA₁₀₄ lisadas por congelamento ao invés de antígeno, para elucidar a presença de reações cruzadas.

4.3.2 Pesquisa de Anticorpos Anti-Encefalomielite Equina dos Tipos Leste e Oeste

A pesquisa de anticorpos anti-encefalomielite equina foi efetuada pela soroneutralização viral em cultura de células, em conformidade com metodologia descrita por Kotait et al. 1992.

4.3.2.1 Amostras de Vírus Padrão

As amostras de vírus padrão da Encefalomielite Eqüina tipo leste (EEE) estirpe TATUI e vírus da Encefalomielite eqüina oeste (WEE) estirpe TRINIDAD foram mantidas em células da linhagem VERO, no Laboratório de diagnóstico da Seção de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico de São Paulo através de passagens sucessivas.

4.3.2.2 Cultura de Células

Células da linhagem VERO mantidas em mocamadas através de cultivos sucessivos em meio mínimo de Eagle (MEM, Cultilab®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®)

4.3.2.3 Soroneutralização Viral em Cultura de Células

A soroneutralização foi efetuada com 25 µl soro diluído na base dois utilizando meio MEM Eagle Cultilab ® em placas de poliestireno de 12,7 x 9,5 cm contendo 96 orifícios de fundo plano. Cada diluição do soro foi testada em triplicata. Foi adicionada a cada um dos orifícios 100 TCID₅₀ das amostras de vírus padrão e a

placa foi incubada por 30 minutos a 37 ° C. A seguir, a cada orifício foi adicionado 100 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 20000 células. As placas foram então incubadas a 37° C durante 72 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Em cada placa foi efetuado o controle de título viral e células não inoculadas.

Decorrido este período de tempo à presença de anticorpos específicos contra os vírus EEE e WEE foi avaliada quanto da ausência de efeito citopático tal como o observado no controle negativo.

4.3.3 Pesquisa de Anticorpos Anti-Infuenza

Feita em conformidade com a metodologia preconizada pelo Manual of diagnostics tests and Vaccines for Terrestrial animals publicado pela OIE em 2004.

4.3.3.1 Amostra Vírus

A amostra H₃N₈ de origem equina foi obtida junto ao Prof. Cláudio Moraes Andrade no Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo mantida em sucessivas passagens em ovos embrionados.

4.3.3.2 Ovos Embrionados de Galinhas

Ovos embrionados obtidos junto ao plantel de galinhas matrizes da empresa Comaves S/A de Londrina-PR, com 7 a 10 dias.

4.3.3.3 Hemáceas de Galinha

Não menos que cinco galinhas em idade de abate (40 a 45 dias de idade) foram desensibilizadas através de choque elétrico e seccionadas as jugulares, o sangue foi colhido de forma asséptica em Erlenmeyer com capacidade para 200 mL com 100 mL de solução de Alsever estéril (Anexo 9.2) mantendo-se agitação delicada e constante. O sangue colhido foi centrifugado a 1500 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo lavado com PBS por três vezes. As hemáceas das aves após este procedimento foram misturadas e guardadas em geladeira (4 a 8°C) por 24 horas para estabilização e posterior uso no teste.

4.3.3.4 Preparo do Antígeno Viral

O vírus amostra H₃N₈ foi inoculado na cavidade alantóidea de 30 ovos embrionados com 7 a 10 dias de idade utilizando-se seringa de 1 ml e agulha do tipo insulina, na dose de 200 ul por ovo. Os ovos foram incubados a temperatura de 37 °

C em câmara úmida e observados em ovoscópio diariamente para morte embrionária. Só foram colhidos os líquidos da cavidade alantóidea de ovos que apresentaram morte embrionária após 72 horas da inoculação. Sob condições assépticas os líquidos foram colhidos separadamente, testados para título viral pela prova de hemaglutinação (HA) de hemáceas de galinha e mantidos congelados a -18°C até o momento do uso.

4.3.3.5. Teste Inibição da Hemaglutinação (HI)

Foi adicionado 25 μl de PBS, pH 7.2 (Anexo 9.2) em 2 fileiras de orifícios de uma placa de 96 orifícios, do tipo em “U”. Foi colocado 25 μl do soro (item 4.1.2) nos dois primeiros orifícios das fileiras testes. Foi diluído em base dois com auxílio de microdiluidores, a partir dos primeiros orifícios nas fileiras testes até a diluição desejada. Após foi adicionado 25 μl do antígeno, contendo 4 UHA a todos os orifícios das fileiras testes. Homogeneizou-se e foi deixado em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após o período de repouso foi adicionado, em todos os orifícios, 25 μl de uma suspensão de hemáceas a 1% em PBS, pH 7.2. Agitou-se e a placa e foi mantida em repouso em temperatura ambiente ($+22^{\circ}\text{C}$) por 45 minutos. Na leitura considerou-se como cavidade reagente onde houve a formação de botão, portanto ocorreu a inibição da hemaglutinação. Para controle da reação foram utilizados controles do soro, antígeno e hemáceas. O título é determinado como a recíproca da maior diluição do soro onde ocorreu a inibição hemaglutinação.

4.3.4 Pesquisa de Anticorpos Anti-*Leptospira spp.*

Foi efetuada em conformidade com a metodologia preconizada por Faine et al. (1999).

4.3.4.1 Antígenos

Os antígenos utilizados para o MAT, são culturas mantidas entre cinco e dez dias a 28°C em meio de Ellighausen (EMJH) enriquecido com soro de coelho e foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. Constituiu-se de culturas vivas de 22 sorovares de *Leptospira spp.*: australis (Ballico), Bratislava (Jez Bratislava), autumnalis (Akiyami A), butembo (Butembo), fortbragg (Fort Bragg), castellonis (Castellon 3), bataviae (Van Tienen), canicola (Hond Utrecht), whitcombi (Whitcombi), cynopteri (3522 C), sentot (Sentot), grippotyphosa (Moskva V), hebdomadis (Hebdomadis), copenhageni (M 20), icterohaemorrhagiae (RGA), panama (CZ 214 K), pomona (Pomona), pyrogenes (Salinem), wolffi (3705), hardjo (Hardjoprajitno), shermani (1342 K) e tarassovi (perepelitsin).

4.3.4.2 Teste da Aglutinação Microscópica (MAT)

Os soros, diluídos inicialmente a 1:100, foram testados frente a todos os antígenos, e aqueles que apresentaram aglutinação nessa diluição foram titulados. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro.

A interpretação dos títulos apresentados pela MAT é definida basicamente em duas situações: a realização de diagnóstico sorológico de um animal na fase aguda ou de convalescença da doença e a segunda situação é avaliar levantamento sorológico de populações de animais sem sinais clínicos da doença. Para a interpretação deste levantamento sorológico consideramos como animal reagente aquele que apresentou título maior ou igual a 100 (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A interpretação dos resultados sorológicos obedeceu ao critério do sorovar mais provável. Para avaliação individual de um animal, o sorovar mais provável é aquele que apresentou o maior título na MAT. O sorovar mais provável em uma população é considerado aquele sorovar que apresentou maior frequência de ocorrência quando computados todos os resultados individuais das amostras testadas desta população (VASCONCELLOS, 1987).

4.3.5 Pesquisa de Anticorpos Anti-Salmonela

Foi utilizada a soroaglutinação rápida em placa em conformidade como a metodologia preconizada por Ley et al. (2000).

4.3.5.1 Antígenos

Foram utilizados os antígenos para detecção de anticorpos anti-*Salmonella pullorum*, produzidos pelos Laboratórios Biovet do Brasil Ltda e Laboratório Intervet do Brasil Ltda.

4.3.5.2 Soro Aglutinação em Placa

As amostras de soros e o antígeno foram previamente mantidos em temperatura ambiente. Sobre uma placa de vidro limpa e desengordurada foi depositado 25 μ L de soro e em seguida 25 μ L do antígeno. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro que foi lavado e seco entre o uso de cada amostra. Movimentos circulares foram realizados com a placa de vidro

enquanto decorreu o tempo de 3 minutos. A leitura foi realizada com auxílio de um negatoscópio.

A formação de grumos na mistura antígeno/soros indicou que o animal apresentava anticorpos anti-*Salmonella pullorum*. Para confirmação dos resultados efetuou-se a diluição dos soros 1:10, com PBS pH 7.2 (Anexo 9.2), e repetiu-se o teste acima. Foram considerados positivos os soros que mantiveram a reação apesar da diluição do soro.

4.3.6 Pesquisa de Anticorpos Anti-Micoplasma

A detecção de anticorpos anti-Micoplasma foi efetuada utilizando-se a técnica da soroaglutinação rápida em conformidade com o preconizado por Ley et al. (2000).

4.3.6.1 Antígenos

Foram utilizados os antígenos anti *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum* produzidos pelo Laboratório Biovet do Brasil Ltda.

4.3.6.2 Soro Aglutinação em Placa

As amostras de soros e o antígeno foram previamente mantidos em temperatura ambiente. Sobre uma placa de vidro limpa e desengordurada foi depositado 25 µL de soro e em seguida 25 µL de um dos antígenos. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro que foi lavado e seco entre o uso de cada amostra. Movimentos circulares foram realizados com a placa de vidro enquanto decorreu o tempo de 3 minutos. A leitura foi realizada com auxílio de um negatoscópio.

A formação de grumos na mistura soro/antígeno indicou que o animal apresentava anticorpos anti-*Mycoplasma gallisepticum* ou *Mycoplasma synoviae*. Para confirmação dos resultados efetuou-se a diluição dos soros 1:10, com PBS pH 7.2 (Anexo 9.2), e repetiu-se o teste acima. Foram considerados positivos os soros que mantiveram a reação apesar da diluição do soro.

4.4 PESQUISA DE *Salmonella spp.* EM SUABE DE CLOACA DE REPRODUTORES

Os suabes de cloacas de reprodutores colhidos (item 4.1.3) foram testados para isolamento bacteriológico para *Salmonella* em conformidade como o preconizado por Nascimento et al. (2000).

4.4.1 Enriquecimento

Os suabes colhidos foram repicados em tubos de meio caldo tetracionato de sódio (20 mL) e incubados à temperatura de 37° C por um período de 12 horas, sendo novamente repicados para um novo tubo de caldo de tetracionato de sódio sendo novamente incubado a temperatura de 37° C por 12 horas.

4.4.2 Isolamento

Retirou-se de forma asséptica do último tubo de meio tetracionato de sódio, 100 µL da cultura que foi depositada em uma placa do meio SS (Salmonela Shigella ágar) e XLT 4 (Difco ®) incubada a 37° C por até 72 horas.

4.4.3 Leitura

Nas placas do meio SS e XLT 4 o aparecimento de colônias incolores com centro enegrecido são sugestivas de bactérias do gênero *Salmonella spp.* As colônias suspeitas foram identificadas pelo sistema LAC EMI, que é um sistema onde se avalia o metabolismo bacteriano através de reações bioquímicas, sendo o seu uso adequado por ser pronto para uso e descartável. Amostras bacterianas

foram ainda testadas nos meios LIA (ágar ferro lisina), TSI (ágar de triplo açúcares) e SIM (ágar ferro motilidade).

5 RESULTADOS

5.1 ROTAVÍRUS

Das 66 amostras de fezes analisadas foi observada a presença de bandas de dsRNA em 6 (6/66=9%) amostras dos filhotes com 1 a 3 meses de idade com sinais clínicos de diarreia discreta.(Figura 08). Para confirmar estes resultados optou-se pela técnica de isolamento viral em células MA₁₀₄ para melhor caracterização das amostras virais.

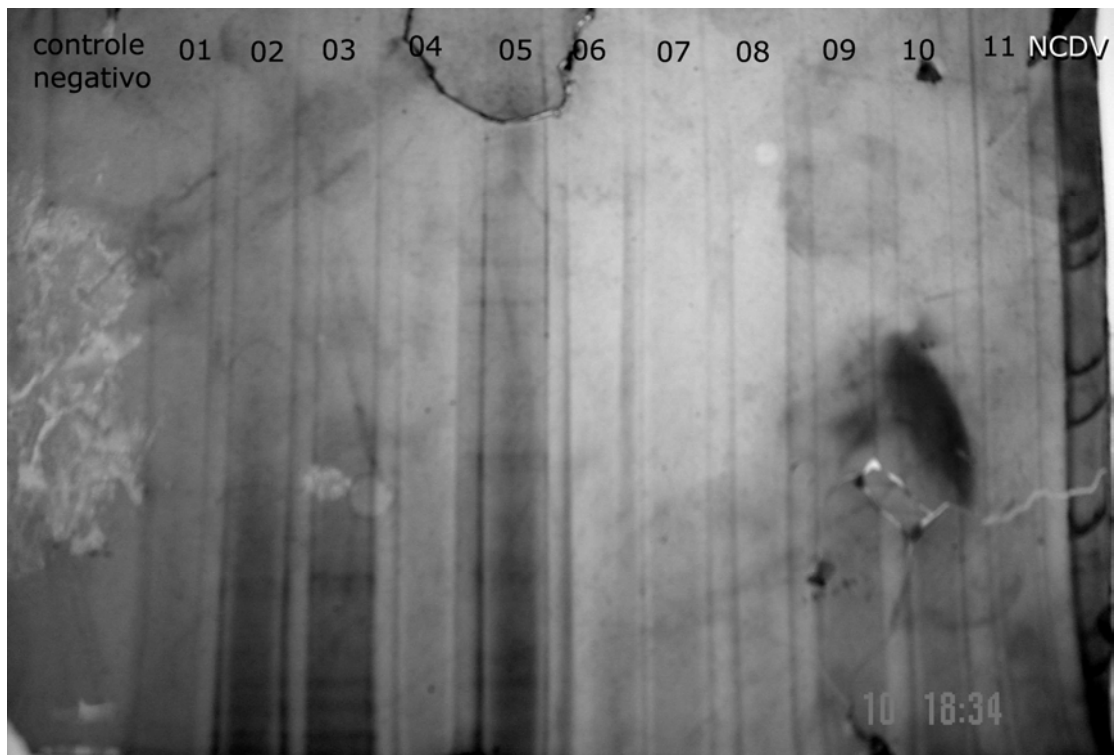


Figura 08- Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando bandas de dsRNA do padrão NCDV na canaleta 13, ausência de bandas na canaleta 01 (controle negativo) e bandas dsRNA nas canaletas 02,03,04, 05, 06 e 07, com as amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente

5.2 ISOLAMENTO.

Das 6 amostras testadas seis amostras apresentaram efeito citopatogênico (ECP) (Figura 10) na monocamada de células MA₁₀₄ na 3^a passagem consecutiva. O ECP foi compatível com o ECP observado no controle positivo NCDV. Monocamada de célula sem ECP foi observada no controle negativo (Figura 09).



Figura 09- Monocamada confluenta de célula MA₁₀₄ após 3^a passagem com 72 horas de cultura mostrando ausência de ECP

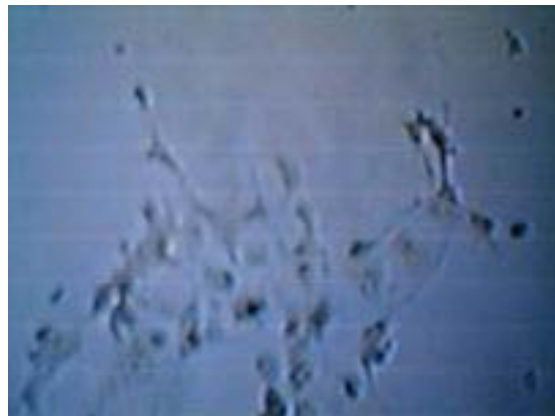


Figura 10- Monocamada de células MA₁₀₄ após 3^a passagem com 72 horas de cultura, mostrando ECP

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE ROTAVÍRUS ISOLADOS DAS FEZES

Das 6 amostras isoladas em células MA₁₀₄ testadas pela PAGE foi observado perfil eletroforético de dsRNA compatíveis com o controle NCDV (Figura 11) em todas as amostras. A migração da banda 3 apresentou maior mobilidade nas amostras isoladas quando comparadas com o padrão NCDV.

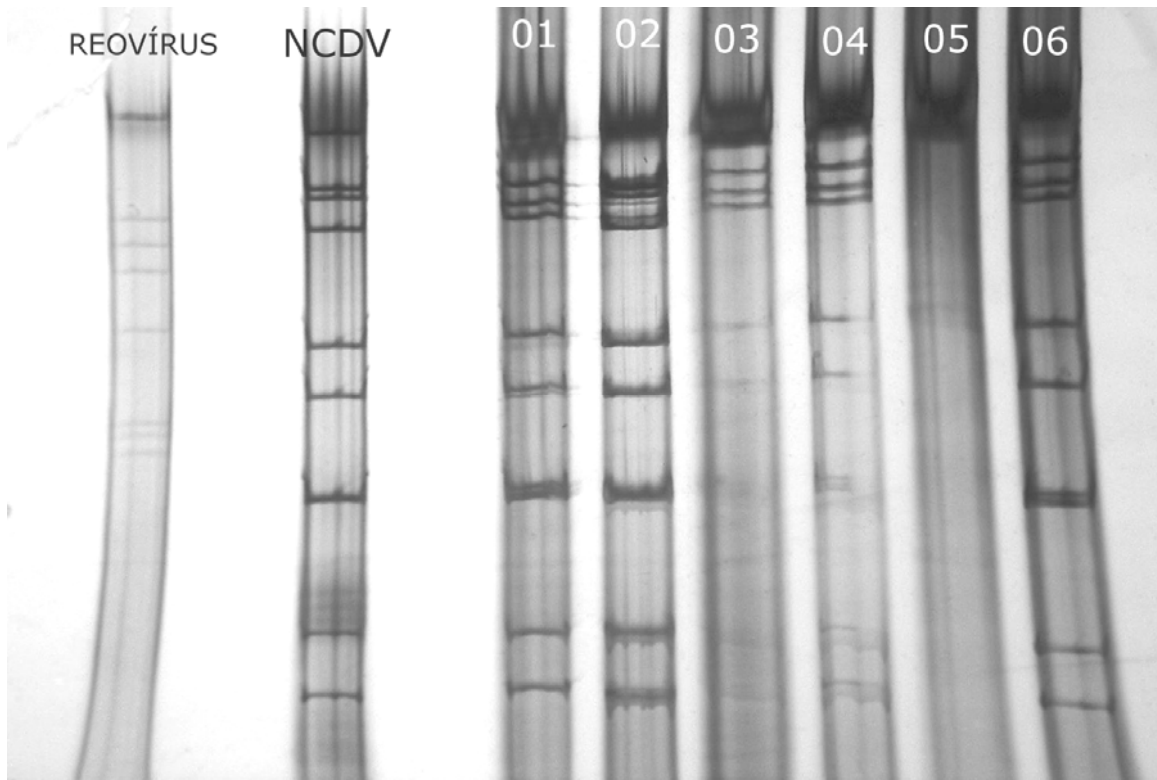


Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando bandas de dsRNA do padrão reovírus na canaleta 01, do padrão NCDV na canaleta 02 e das amostras 02, 03, 04, 05, 06, 07 nas canaletas 03, 04, 05, 06, 07,08 respectivamente. Na canaleta 09 observa-se ausência de bandas no controle negativo

5.4 GENOTIPAGEM

Das 6 amostras testadas (Quadro 06) todas puderam ser caracterizadas pela RT-PCR em pelo menos um genótipo G e/ou P. O resultado demonstrou duas amostras com genótipos G[6] P[1], 1 amostra com G[10] P[1] (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16). Três amostras não foram caracterizadas para o genótipo G, mas o foram para o genótipo P sendo duas amostras P[1], P[7] e uma amostra P[1] (Tabela 01).

Tubo da reação	Identidade do material
1	02/05L
2	03/05L
3	04/05L
4	05/05L
5	06/05L
6	07/05L
7	NCDV

Quadro 05-Identificação das amostras de rotavírus para genotipagem

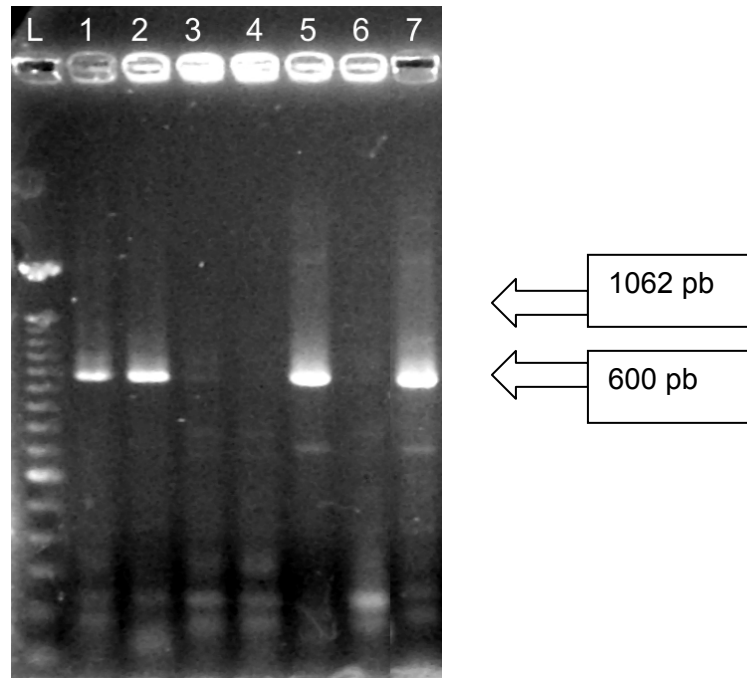


Figura 12- Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1ª amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus

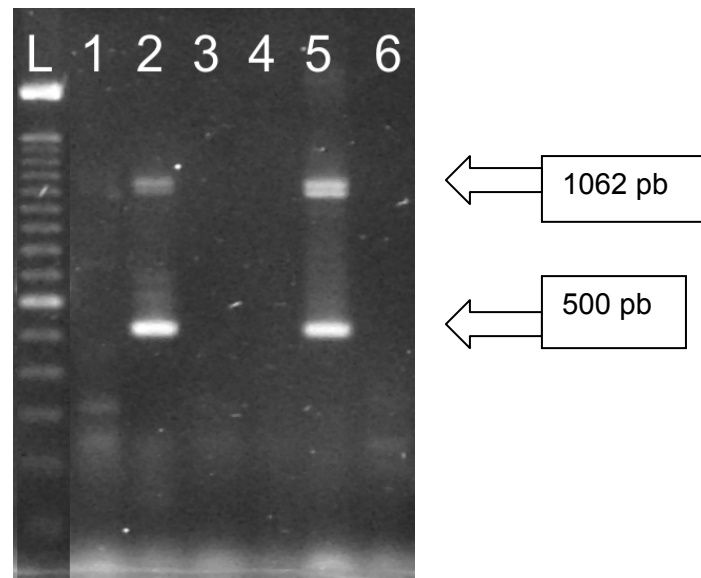


Figura 13- Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1ª tentativa de 2ª amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus

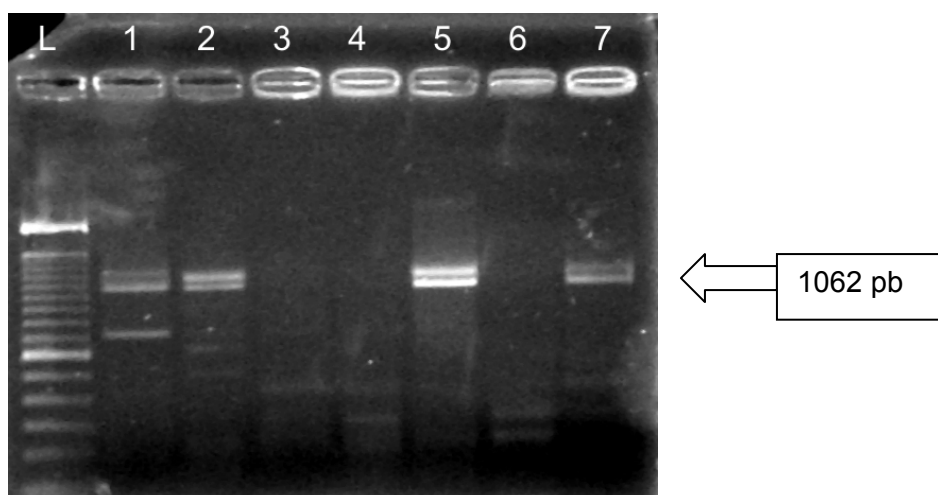


Figura 14- Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 2ª tentativa de 2ª amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP7 (genótipos G) dos rotavírus

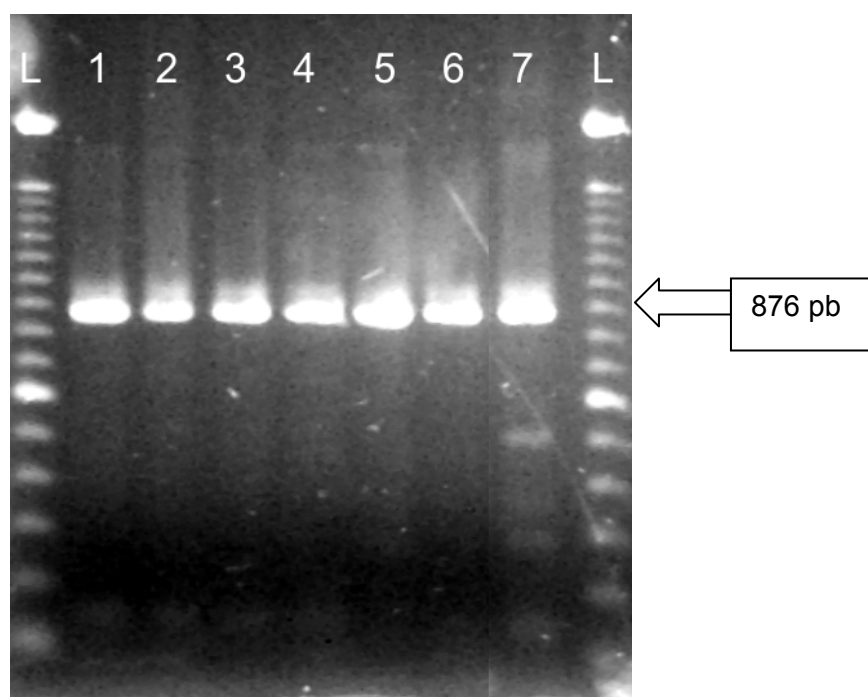


Figura 15- Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando o produto da 1ª amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP4 (genótipos P) dos rotavírus

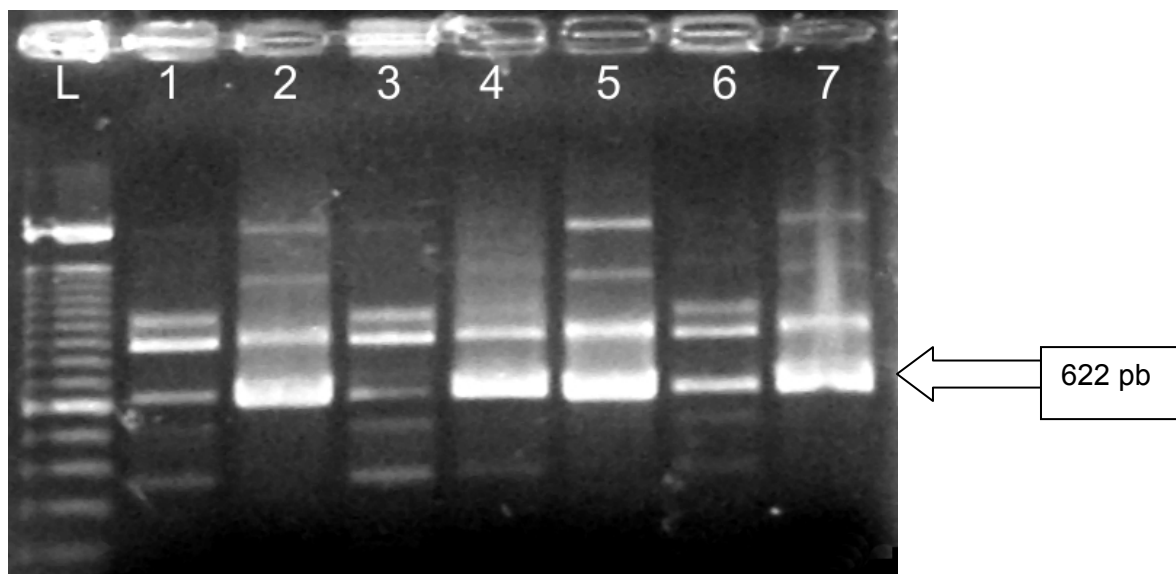


Figura 16- Gel de agarose corado com brometo d etídio mostrando o produto da 2ª amplificação da RT-PCR para os genes da proteína VP4 (genótipos P) dos rotavírus.

Tabela 01-Resultados da genotipagem utilizando a técnica da RT-PCR em rotavírus isolados de fezes de avestruzes colhidas em criações comerciais de municípios do Norte do Paraná. São Paulo 2006

AMOSTRA	Amplificação G	Genótipo G encontrado	Amplificação P	Genótipo P encontrado
02/05L	SIM	10	SIM	1
03/05L	SIM	6	SIM	1
04/05L	NÃO	nt	SIM	1 e 7
05/05L	NÃO	nt	SIM	1 e 7
06/05L	SIM	6	SIM	1
07/05L	NÃO	nt	SIM	1

nt – não tipificada

5.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ROTAVÍRUS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA CONTRAIMUNOELETROOSMOFORESE (CIEOF).

Das 182 amostras de soro submetidas à prova da contraimunoelctroosmoforesse foram reagentes 10 amostras ($10/182= 5,5\%$) sendo 7 amostras provenientes da propriedade A ($7/40=17,5\%$) 3 amostras da propriedade B ($3/29=10,3\%$), 7 propriedades não apresentaram nenhum animal reagente (Tabela 02).

Tabela 02- Detecção de anticorpos anti-rotavírus pela técnica da CIEOF, em soros de 182 avestruzes de criações comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná, colhidos no período de junho de 2002 a junho de 2004. São Paulo, 2006

PROPRIEDADE	Nº TOTAL ANIMAIS	Nº ANIMAIS POSITIVOS
A	40	7
B	29	3
C	24	0
D	25	0
E	10	0
F	11	0
G	16	0
H	5	0
I	22	0
TOTAL	182	10

5.6 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-EEEV e WEEV.

Das 155 amostras de soro submetidas à soroneutralização para pesquisa de anticorpos anti-EEEV e anti-WEEV nenhuma foi reagente.

5.7 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA *Influenza* H₃N₈

Das 182 amostras testadas pela técnica da inibição da hemaglutinação para detecção de anticorpos anti-vírus da *Influenza* H3 nenhuma amostra foi reagente.

5.8 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp.

Das 128 amostras testadas 19 (19/128=14,8%) foram reagentes a um ou mais sorovares, dentre os sorovares o de maior frequência de ocorrência foi o sorovar Shermani com 8 (8/128= 6,2%) amostras reagentes, seguido do sorovar Butembo com 7 (7/128=5,4%) amostras reagentes. Anticorpos contra 9 sorovares foram detectados, o título mais frequente foi 100 (13/128=10,1%) o título mais alto foi 800 para o sorovar Sentot seguido de 400 para o sorovar Hardjo. Animais reagentes para o sorovar Butembo foram encontrados em 100% das propriedades (Tabela 03).

Tabela 03 -Resultado da MAT para sorovares de *Leptospira interrogans* em soros de reprodutores de criações comerciais de avestruzes colhidos no período de junho de 2002 a junho de 2004, em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006

PROPRIEDADE	Nº animais na propriedade	Identificação do animal	Sorovar	Título
A	40	24	Butembo	100
		17	Hardjo	400
		15	Hardjo	200
B	29	6	Bratislava	200
		24	Butembo, pomona, shermani, sentot	100
		25	Pomona	100
		22	Butembo e pomona	100
		22	Panama	200
		18	Sentot	400
C	24	3	Bratislava	200
		6	Butembo, shermani	100
		10	Shermani	100
		4	Shermani, panama	100
		12	Shermani	100
		14	Pomona, sentot	100
		14	Shermani	200
D	25	20	Shermani	100
		20	Butembo	200
		24	Bataviae, shermani	100
		24	Sentot	800
E	10	9	Casteloni	200
		9	Butembo	100
		3	Butembo	100
TOTAL	128	19		

5.9 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI - *Salmonella pullorum*

Das 182 amostras testadas 17(17/182=9,3%) das amostras foram reagentes, sendo que a propriedade com maior frequência de ocorrência foi de 7 (7/40=17,5%) amostras reagentes. Das 9 propriedades pesquisadas 7 (7/9=77%) tiveram pelo menos uma amostra reagente, permanecendo 2 (2/9=13%) propriedades sem animais reagentes (Tabela 04).

Tabela 04- Resultados da soro aglutinação em placa para detecção de anticorpos anti-*Salmonella pullorum* em soros de avestruzes de criações comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006

PROPRIEDADE	TOTAL DE ANIMAIS	ANIMAIS REAGENTES
A	40	7
B	29	1
C	24	4
D	25	0
E	10	0
F	11	1
G	16	1
H	5	1
I	22	2
TOTAL	182	17

5.10 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

Das 182 amostras testadas para o *Mycoplasma gallisepticum* 15 (15/182=8,2%) dos animais foram reagentes. A propriedade com maior frequência de ocorrência obteve 6 (6/40=15%) de animais reagentes e 5 (5/9=55%) das 9 propriedades testadas tiveram amostras de soros reagentes permanecendo 4 (4/9=45%) propriedades com amostras não reagentes. Das 182 amostras testadas para o *Mycoplasma synoviae* 47 (47/182=26,2%) dos animais foram reagentes. A propriedade com maior frequência de ocorrência obteve 20 (20/24=83%) animais reagentes e 7 (7/9=77%) das 9 propriedades tiveram amostras de soros reagentes permanecendo 2 (2/9=23%) propriedades com amostras não reagentes (Tabela 05).

Tabela 05- Resultados obtidos da soroaglutinação em placa para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em soros de aves de criação comerciais em municípios do Norte do Estado do Paraná. São Paulo 2006

PROPRIE DADE	TOTAL ANIMAIS	Reagentes para <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Reagentes para <i>Mycoplasma synoviae</i>
A	40	6	3
B	29	0	15
C	24	0	20
D	25	0	0
E	10	0	0
F	11	2	1
G	16	3	4
H	5	1	1
I	22	3	3
TOTAL	182	15	47

5.11 CULTURA BACTERIOLÓGICA DE SUABES DE CLOACA PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp

Das 100 amostras testadas não foi isolada nenhuma bactéria considerada pertencente ao gênero *Salmonella* spp.

6 DISCUSSÃO

A PAGE foi utilizada como técnica de triagem para a detecção de rotavírus nas fezes de avestruzes por que é um dos métodos diagnósticos mais empregados na detecção do dsRNA de rotavírus em fezes de animais e humanos, tendo como vantagem de detectar rotavírus de quaisquer soro grupos (DOLAN et al., 1985; FENER et al., 1987; MARKOWSKA et al., 1996; THEIL; REYNOLDS; SAIF, 1986).

Das 66 amostras analisadas 6 delas (6/66=9%) apresentaram perfil de migração eletroforética compatível com o sorogrupo A, todavia a intensidade das bandas visualizadas estava muito tênue, comprometendo a visualização e a documentação adequadas (Figura 08). Situação semelhante foi observada por Tamehiro (2003) em parte das amostras de fezes de galinhas positivas ao teste e foi atribuída à baixa quantidade de vírus nas amostras e ou presença de infecções mistas com diferentes rotavírus, reovirus e picobirnavírus. Todd e McNulthy (1986) analisando amostras de fezes de aves através da técnica da PAGE, encontraram 5 eletroferogrupos distintos dos conhecidos, não sendo possível a identificação dos eletroferotipos observados. Mascarenhas et al. (1997) ao analisar 4 amostras humanas também não conseguiu definir um perfil de eletroferótipo e realizou a genotipagem das amostras por RT/PCR, para a sua identificação tendo como resultado amostras aviárias G[2] P[4].

Como o resultado observado no presente estudo, a presença de rotavírus através da técnica de PAGE em aves foi descrita por Bellinzoni et al. (1987) em uma criação comercial de frangos na Argentina, que apresentava episódios de diarreia, onde 10 amostras positivas na PAGE foram negativas no teste ELISA para rotavírus

do tipo A. Na microscopia eletrônica ficou evidenciada a presença de partículas virais indistinguíveis de rotavírus que foram consideradas como rotavírus atípicos. Na Índia Wani et al. (2003) encontrou, 3 amostras positivas por PAGE e ELISA para rotavírus do tipo A com perfil eletroforético de rotavírus de mamíferos em 75 amostras de fezes provenientes de uma granja de frangos com sinais clínicos de diarreia.

Na Inglaterra McNulthy, Allan e McCracken (1983) relatam a presença de rotavírus em galinhas pela técnica de PAGE e demonstraram através da infecção experimental, sinais clínicos e aspectos virológicos da infecção. Nos EUA Bergeland, Mcadaragh e Stottz (1977) relataram a presença de rotavírus através da técnica de PAGE em perus. A presença de rotavírus nas fezes de faisões com sinais clínicos de diarreia foi descrita por Legrotaglie et al. (1997) na Itália, através do isolamento do vírus em culturas de células MA₁₀₄ e caracterização do perfil eletroforético como rotavírus do tipo A pela PAGE. Para nosso conhecimento a presença dsRNA de rotavírus através da técnica de PAGE não foi descrita na literatura consultada até o momento em avestruzes, tanto no Brasil quanto no exterior.

Com o intuito de melhorar a intensidade das bandas procedeu-se a tentativa de isolamento para aumentar concentração viral. Através do isolamento das 6 amostras positivas a técnica de PAGE, em cultura de células da linhagem MA₁₀₄ observou-se que todas apresentaram efeito citopático característico e compatível com o observado em amostra NCDV cultivada como controle positivo a partir da 3ª passagem. A utilização do isolamento de rotavírus a partir de amostras fecais em cultura de células é preconizada para permitir a melhor caracterização de amostras de fezes que evidenciaram o dsRNA de rotavírus pela técnica da PAGE

(ELSCHNER et al., 2005; FUKUSHO; SHIMIZU; ITO, 1981; MARKOWSKA et al., 1996; RAMOS et al., 2000; SAIF et al., 1988; THEIL; BOHL; SAIF, 1978).

A PAGE foi utilizada para a caracterização do RNA vírus segmentados isolados a partir das 6 amostras fezes. Pode-se evidenciar o perfil eletroforético característico de rotavírus do tipo A em 5 delas. Neste perfil eletroforético observou-se uma maior mobilidade da banda 3 do dsRNA dos vírus isolados quando comparado com o padrão NCDV. Tal fato demonstra que apesar de serem do mesmo sorogrupo, pequenas diferenças na migração dos segmentos de dsRNA puderam ser observadas quando do isolamento de amostras de campo nas células MA₁₀₄. Com efeito, o isolamento e a propagação das amostras de vírus na cultura de célula, permitiu a melhor visualização das bandas de dsRNA de rotavírus na PAGE para a caracterização (FUKUSHO; SHIMIZU; ITO, 1981). Este procedimento com resultados semelhantes, também foi descrito por Legrottaglie et al. (1997) em amostras de rotavírus isolados de faisões e Elschner et al. (2005) em amostras de rotavírus isolados de eqüinos.

A caracterização dos rotavírus isolados dos avestruzes com diarréia através da RT/PCR foi empregada para se estabelecerem mecanismos de vigilância e controle das infecções além de evidenciar a distribuição dos genotipos destes vírus nas diferentes populações (BARREIROS et al., 2004; KOSTOUROS et al., 2003). O diagnóstico da presença de rotavírus em focos da doença em animais e seres humanos, só permite uma análise aprofundada quando se consegue chegar à determinação das características genotípicas das amostras (ALFIERI et al., 1999; ALFIERI et al., 2004; BANYAI et al., 2004; ELSCHNER et al., 2005).

A caracterização dos rotavírus isolados nas fezes de avestruzes com diarréia, através da técnica da RT-PCR, conduziu a genotipagem binária de 3 amostras,

sendo 2 delas com G[6]P[1] e uma amostra G[10]P[1]. Embora não tenha sido definido o genótipo G uma amostra apresentou genótipo P[1] e duas amostras P[1][7].

Os genótipos observados nas amostras de avestruzes apresentaram genótipos tipicamente descritos em bovinos, como evidenciado por Fodha et al. (2005) que estudando a prevalência de genótipos de rotavírus em bovinos na Tunísia, encontrou os genótipos G6 e G8, sendo que em estudo anterior havia a predominância do genótipo G6. Barreiros et al. (2004) estudando a prevalência de rotavírus na diarréia de bezerros vacinados e não vacinados nos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná encontrou um predomínio dos genótipos G6 P[5] seguidos de G6 P[1] e G6 P[11]. O genótipo G8 P[1][11] também foi encontrado. Este comportamento com predomínio do genótipo G6 em bovinos demonstra haver uma distribuição regional, pois Brito et al. (2000) estudando a prevalência de rotavírus no Estado de Goiás obteve o genótipo G10 como o mais prevalente.

Alfieri et al. (2004) analisando um RT-PCR multiplex para a detecção de rotavírus em fezes de bovinos encontrou G[6]P[5] como o genótipo mais prevalente seguido de G10P[1], G8P[11] e G5 encontrado como o mais prevalente em suínos por Barreiros et al. (2003). Os genótipos G[6] e G[10] caracterizados nas amostras de fezes dos avestruzes no presente estudo são típicos de bovinos no Brasil. O genótipo P[1] apresenta as mesmas características de rotavírus de origem bovina, o genótipo P[7] apresenta característica de genótipos encontrados em suínos.

A presença de genótipos tipicamente bovinos em avestruzes nos faz admitir como hipótese a possível transmissão interespecie, pois ocorre em muitas propriedades à criação consorciada entre bovinos, ovinos e avestruzes, apesar da criação dos animais não ser efetuada concomitantemente, sendo que os bovinos e

ovinos são usados para manter as pastagens baixas nos piquetes de criação dos avestruzes. Martella et al. (2005) analisando amostras de rotavírus P[6] humanos e de suínos levantou fortes indícios da ocorrência da transmissão interespecies em pelo menos 3 ocasiões. Wani et al. (2003) na Índia mediante a técnica de PAGE analisou o perfil eletroforético de 3 amostras de rotavírus, concluindo que as amostras tinham padrão de mobilidade de bandas de dsRNA 4-2-3-2 característico de amostras de mamíferos e não 5-1-3-2 como as observadas em amostras aviárias e sugere que neste foco da doença, tenha ocorrido a transmissão interespecies de rotavírus de mamíferos para as aves.

A possível transmissão interespecies é reforçada pelo fato dos rotavírus apresentarem resistência ao meio ambiente tal como demonstrado por Ramos et al. (2000) o que pode ser atribuída uma transmissão por via indireta. Os genótipos mais presentes em populações humanas no Brasil são os G1 P[8], G1P[4], G2P[4], G3, G4, G8 e G9P[8] não encontrados nos resultados obtidos, que contribui para a origem em bovinos e não humanos dos genótipos nestas criações desta região no Brasil (ADAH et al., 1997, BARREIROS et al., 2003; KOSTOUROS et al., 2003; MASCARENHAS et al., 1997).

Por outro lado à pesquisa de anticorpos anti-rotavírus em uma população permite determinar o histórico de contato do vírus com uma população devido à presença da “cicatriz” imunológica (BRANDÃO et al., 2002). A contraímunoeletroosmoforese foi utilizada para determinar a presença de anticorpos em 182 soros de avestruzes de 9 propriedades. O resultado obtido foi a presença 10 animais reagentes (10/182) sendo 7 (7/40) animais reagentes na propriedade A e 3 (3/29) animais reagentes na propriedade B. As demais propriedades não apresentaram animais reagentes.

Os dados obtidos na literatura são escassos no que diz respeito à resposta imune humoral aos rotavírus em avestruzes. A prova da contraimunoeletrosmoforese apresenta como característica ser de baixa sensibilidade e especificidade. Sabe-se que as que as infecções pelo rotavírus são características de animais jovens em aves e mamíferos e as amostras de soros colhidas foram de animais entre 2 a 5 anos de idade. O título de anticorpos necessário para uma reação positiva na prova da contraimunoeletrosmoforese tem que ser alto, pois a prova tem um alto limiar de detecção (BRANDÃO et al., 2002).

De acordo com as Figuras 08, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 e Tabela 02, houve concordância entre a propriedade A e B, no que diz respeito à associação entre a presença de anticorpos anti-rotavírus e a detecção de rotavírus. Corrobora estes achados, o fato da propriedade B criar animais reprodutores adquiridos da propriedade A.

Estes resultados abrem perspectivas para a realização de novos estudos sobre o impacto da presença dos rotavírus na criação de avestruzes no Brasil. Os prejuízos provocados pelas enterites causadas pelos rotavírus em outras espécies animais têm grande importância. Criações em fase de implantação no Brasil como a estrutuicultura podem ser inviabilizadas por estes prejuízos.

Medidas como as instituídas pela Instrução Normativa Conjunta nº 2 de 21 de fevereiro de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que visam a normatização da criação de avestruzes no Brasil, avançaram nas relações da criação das avestruzes em relação a outras espécies aviárias, mas não esclareceram sobre a estrutuicultura na presença de outras espécies animais.

Com relação à Influenza há relatos de surtos em avestruzes na África do Sul, Dinamarca e Itália e a realização de levantamentos sorológicos para detecção da

presença de anticorpos anti-Influenza vírus é justificada para se acompanhar a distribuição geográfica dos sorotipos circulantes nas diferentes populações animais (ALLWRIGHT et al., 1993; CAPUA et al., 2000; JORGENSEN et al., 1998; WEBSTER et al., 1992).

Dos 182 avestruzes reprodutores testados nenhum animal foi reagente. No presente levantamento sorológico o intuito de se avaliar a frequência da ocorrência de anticorpos para hemaglutinina H₃ esta relacionada a prevalência desta nas populações, humana, de suínos, de eqüinos e aves onde haveria a maior probabilidade dos avestruzes já terem entrado em contato com este sorotipo do vírus (ARENAS et al., 1990; DE MARCO et al., 2004; MANCINI et al., 2004; WEBSTER et al., 1992).

A ausência de animais reagentes por outro lado pode ser explicada por várias hipóteses uma delas esta relacionada ao fato dos avestruzes não apresentarem comportamento dócil para com seus tratadores e que o sistema de criação não favorece um contágio dos animais e seus tratadores como o observado por Myers et al. (2006) em suínos, pois os animais permanecem em piquetes a céu aberto, o que não favorece a transmissão do vírus.

Não existem equinos ou asininos nas propriedades estudadas, que são reservatórios do vírus da *Influenza* H₃N₈. No Brasil tem importância epidemiológica os vários surtos causados por este sorotipo de vírus em populações de equinos como demonstrado por Oliveira et al. (2005b) em cavalos apreendidos no Estado do Rio de Janeiro.

A importância das aves silvestres na transmissão da influenza não poderia ser negligenciada e os resultados obtidos por Anraku, Faria e Takeyama (1971) na detecção de anticorpos anti - *Influenza* A em aves silvestres no Estado de São

Paulo, demonstraram a presença de uma ave da espécie *Columbigallina talpacoti* (rolinha) reagente, que é presente na região Norte do Paraná e convive com as avestruzes se alimentando dos restos de ração e alimentos dos cochos. O contato dos avestruzes com estes animais selvagens é um fator de risco.

Aves migratórias têm importante papel na disseminação da Influenza aviária, o Norte do Paraná faz parte da rota migratória de aves, mas estudos sobre o impacto destas aves são escassos e com resultados negativos para a detecção do vírus da *Influenza A* nos pássaros da ordem *Anatidae* como descrito por Soares et al, (2005) no Estado de São Paulo.

A panzootia de Influenza aviária altamente patogênica causada pelo sorotipo H₅N₁ que afetou vários países entre 1959 e 2006 e as implicações desta na saúde humana e na economia mundial justificam pesquisas direcionadas à avaliar os riscos que determinadas espécies possam representar na manutenção e disseminação dos VI.

Aves são sensíveis ao EEE/WEE e são utilizadas como sentinelas nos EUA pela Divisão de Doenças virais transmitidas por Vetores do CDC (Center for Diseases Control), produzindo anticorpos detectáveis em inoculações experimentais e infecções naturais (CALISHER et al., 1986; OLSON et al., 1991).

A pesquisa da presença dos anticorpos anti- EEEV/WEEV é justificada pois o vírus já foi isolado de um caso de enterocolite em emas nos EUA e demonstrou em infecção experimental em avestruzes os mesmos sinais clínicos observados nas emas (BROWN et al., 1993).

A técnica de soro neutralização viral em cultura de tecido foi utilizada para se detectar a presença de anticorpos anti- EEEV/WEEV, pois em populações sensíveis a persistência de anticorpos específicos neutralizantes fornece importantes

informações sobre a cadeia epidemiológica do vírus. Dos 182 soros de avestruzes reprodutores que foram testados nenhum foi considerado reagente. A técnica de soroneutralização foi utilizada para este fim por Calischer e Karabatsos (1988), Calisher et al. (1990), Kotait et al. (1992).

A ausência de animais reagentes pode estar associada a condições micro regionais relacionadas a cadeia epidemiológica bastante complexa deste vírus. O surto de EEE envolvendo cavalos no Estado do Paraná em 1996 e 1997, descrito por Fernández et al. (2000), foi diagnosticado através do levantamento sorológico em eqüinos nas propriedades afetadas, mas a detecção do agente nas 25 espécies de artrópodes *culicideos* não logrou êxito, demonstrando que muitos fatores participam neste processo e nem sempre são detectados.

A vigilância da presença do vírus na cadeia epidemiológica e inquéritos sorológicos em animais susceptíveis é um importante mecanismo para o conhecimento da doença, como foi indicado por Lopes e Sachetta (1974), com o intuito de se tomar medidas preventivas como intensificar a vacinação dos animais sensíveis em uma região.

A leptospirose é uma importante zoonose de mamíferos e são escassos os relatos de levantamentos sorológicos em outras espécies animais incluindo as aves que são consideradas refratárias à leptospirose por possuírem temperatura corporal mais elevada que a dos mamíferos, no entanto cabe ressaltar que a temperatura média corporal observada em avestruzes é de 38,8°C muito próxima da observada em mamíferos que possibilitaria a multiplicação das *Leptospiras* spp. nesta espécie.

A técnica da MAT foi utilizada no presente estudo porque ela é preconizada pela Organização Mundial da Saúde e apresenta a vantagem de detectar diversos

sorogrupos podendo-se aumentar ou diminuir os sorovares, de acordo com a necessidade, sendo esta técnica apropriada para se utilizar em levantamentos sorológicos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; OLIVEIRA et al., 2005a).

A MAT foi utilizada para a detecção de anticorpos anti-leptospira e os resultados foram apresentados na Tabela 03. A média da frequência de ocorrência dos sorovares nas propriedades foi de 14,8% e não podemos confrontar os dados obtidos com a literatura pertinente, pois estes são escassos para aves.

A análise dos resultados obtidos na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em 128 amostras de soros de avestruzes reprodutores, evidenciado na Tabela 03, indicou a presença de 9 sorovares sendo Shermani (8/128=6,2%), (Butembo (7/128=5,4%), Pomona (4/128=3,1%), Hardjo (4/128=3,1%), Sentot (4/128=3,1%), Bratislava (2/128=1,5%), Hardjo (2/128=1,5%), Panama (2/128=1,5%), Bataviae (1/128=0,78%) e Casteloni (1/128=0,78%). O sorovar Butembo estava presente em todas as propriedades (9/9) e o sorovar Shermani o mais frequente nos animais reagentes (8/19=42%). Os títulos mais elevados observados foram os do sorovar Sentot com título 800 e 400 em propriedades distintas seguido do sorovar Hardjo com título 400, sendo que o predomínio de títulos observados foi 100 (21/31=68%) seguido de 200 (7/31=23%), 400 (2/31=6,0%) e 800 (1/31=3,0%).

Na Etiópia em levantamento sorológico realizado por Moch et al. (1975) em espécies silvestres e domésticas e Barsoum, Botros e Morcos (1978) no Egito em cavalos e asininos encontraram como sorovar mais freqüente o sorovar Butembo, como o observado no presente estudo, as aves silvestres testadas por Moch et al. (1975) não foram reagentes, enquanto que mamíferos silvestres e mamíferos domésticos apresentaram elevada freqüência de ocorrência de animais reagentes,

indicando que possíveis reações inespecíficas não são comuns em levantamentos com amostras aviárias.

Levett (2001) relata que os bovinos são tradicionais reservatórios dos sorovares Hardjo, Pomona e Gripotyphosa e os ovinos dos sorovares Hardjo e Pomona e observamos que existe a ocorrência de avestruzes reagentes aos sorovares hardjo e pomona com títulos considerados altos de até 400. Uma hipótese de possível contato dos avestruzes com estes sorovares seria a manutenção de ovinos e bovinos juntamente com os avestruzes, que não possuem capacidade de consumo de pastagem adequada, permanecendo nos piquetes dos avestruzes pastagens muito altas, sendo necessário colocar nos piquetes, após a retirada dos avestruzes, os bovinos ou ovinos para consumirem a pastagem excedente. O contágio pode acontecer em áreas úmidas próximas aos cochos de água, pois um fator limitante para a transmissão é a conhecida sensibilidade das *Leptospira* spp. a dessecação (BRANDLING-BENNETT; PINHEIRO, 1996; EVERARD; EVERARD, 1993)

Outra possível via de transmissão a ser considerada é a contaminação de alimentos e água dos avestruzes pela urina de animais silvestres e sinantrópicos como o observado por Corrêa et al. 2004 em animais do Parque Zoológico de São Paulo, que explicaria o fato dos avestruzes apresentarem a maior frequência de anticorpos para o sorovar Butembo associado a roedores silvestres (FAINE et al., 1999, BRANDLING-BENNETT; PINHEIRO, 1996).

Levantamentos sorológicos efetuados por Cadman et al. (1994) e Ley et al. (2000) em criações de avestruzes, demonstraram a importância dos levantamentos sorológicos no estudo da salmonelose em populações susceptíveis e justificam a sua realização.

Cadman et al. (1994) em um levantamento sorológico para *Salmonella enteritidis* em 149 avestruzes de nove criadouros no Zimbábue demonstraram uma menor prevalência de propriedades com animais reagentes 6 (6/9) em comparação com 7 (7/9) obtidos no presente trabalho. A maior frequência de ocorrência animais reagentes por propriedade foi 60%, obtidas no levantamento sorológico no Zimbábue contra 17,5% observados no presente estudo. A faixa etária dos animais observados no Zimbábue variava de 3 a 9 meses de idade e os animais testados no presente estudo tinham de 2 a 5 anos.

O teste de aglutinação rápida em placas apresenta resultados fidedignos quando utilizado em levantamento sorológico e detecção de anticorpos específicos para *Salmonella* spp. como demonstrado Proux et al. 2002 onde utilizando inoculação experimental de galinhas com *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* comparou os testes de aglutinação rápida em placa com o ELISA. O teste de aglutinação rápida detectou 100% dos animais infectados artificialmente, após 10 semanas de inoculação, observando-se a alta sensibilidade do teste da soro aglutinação em placa.

Gast, Porter e Hold (1997) correlacionaram os resultados obtidos por levantamentos sorológicos de populações de galinhas poedeiras com a contaminação de ovos por *Salmonella enteritidis* com uma correlação positiva para alta frequência de animais reagentes e ovos contaminados, levando a hipótese de contaminação dos ovos e na sequência a contaminação da prole dos avestruzes reagentes.

Resultados obtidos por Ley et al. (2000) em um levantamento sorológico em 163 avestruzes em idade de abate (10 a 12 meses) utilizando a técnica de aglutinação rápida em placa para *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum* e

Salmonella typhimurium nos Estados de Ohio e Indiana EUA, obtiveram 100% de animais não reagentes, estes dados quando confrontados com os obtidos no presente estudo corroboram o fato que condições sanitárias inadequadas possibilitaram que os avestruzes tivessem contato com *Salmonella* spp. A presença de animais com anticorpos anti-*Salmonella pullorum* em criações comerciais de aves decorre da transmissão vertical e horizontal destas bactérias (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1998).

Os avestruzes são mantidos em piquetes não cobertos, a água e a ração são fornecidas em cochos sem proteção, que permite o acesso de roedores silvestres, aves domésticas e silvestres aos alimentos. Podem ainda desempenhar importante papel as tradicionais vias de transmissão através do contato direto e indireto.

No Brasil quando da instalação dos primeiros plantéis ocorreram compras de reprodutores sem testes sorológicos ou testes que detectassem a presença de patógenos como *Salmonella* spp., não sendo descartada a possibilidade de serem adquiridos animais reagentes tanto para a sorologia quanto para a presença da bactéria. Por falta de conhecimento dos produtores, muitas criações começaram em condições não apropriadas do ponto de vista sanitário, com a manutenção de galinhas “caipiras” criadas livremente entre os avestruzes, sendo estas importantes fontes de infecção para outros patógenos como foi evidenciado por Pereira et al. (2005) para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em Uberlândia MG.

Outra possível via de transmissão é a veiculação da *Salmonella* spp. na ração ou suplementos como a farinha de carne. Muitos criadores compram ração formulada ou formulam a ração na propriedade, muitas vezes com insumos sem o devido controle de qualidade. Hofer, Silva Filho e Reis (1998) ao analisar o resultado da tipificação de amostras de *Salmonella* spp. isoladas a partir de ração ou insumos

no período de 1976 e 1979 à 1991, verificaram a importância da veiculação de *Salmonella* spp. na população animal através das rações, pois os sorovares que eram identificados por um período mais longo nas rações, acabavam sensibilizando os animais nas provas sorológicas, devido a uma infecção ou estágio de portador temporário ocasionado pela ingestão contínua de rações contaminadas.

Levantamentos sorológicos para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* realizados por Cadman et al. (1994) e Ley et al. (2000) e o agente sendo isolado em avestruzes justifica a pesquisa da frequência de anticorpos nestes animais pela importância que a identificação de possíveis reservatórios representam para indústria avícola brasileira.

A técnica da soro aglutinação rápida para detecção de anticorpos anti - *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* têm como característica apresentar resultado falso positivo, como citado por Feberwee et al. (2005).

Resultados obtidos e expressos na Tabela 05 demonstraram duas (2/9=22,2%) propriedades onde todos os animais aparecem como não reagentes e 7 (7/9=77,8%) propriedades onde houve a ocorrência de animais reagentes, sendo que em uma propriedade a frequência foi considerada alta (83%), não obstante a mesma metodologia e os mesmos reagentes foram empregados em todos os testes.

Anticorpos anti-*Mycoplasma gallisepticum* não foram observados em 4 (4/9=44,4%) propriedades e duas (2/9=22,2%) não apresentaram anticorpos para *Mycoplasma synoviae*.

Cadman et al. (1994) em um levantamento sorológico para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* através de ELISA em 149 avestruzes de nove criadouros no Zimbabwe, encontrou 4 propriedades onde os animais foram não

reagentes e 5 propriedades onde a frequência da ocorrência variou de 5 a 60% de animais reagentes.

Para *Mycoplasma gallisepticum* os resultados obtidos da frequência de ocorrência variou de 13 a 20% em 5 (5/9=55,5%) propriedades e de 15 (15/182=8%) do total de soros analisados. Para *Mycoplasma synoviae* a avaliação da frequência de ocorrência por propriedades variou de 9 a 83% sendo a frequência de ocorrência na totalidade dos soros foi de (47/182=25,8%). A correlação dos dados obtidos no presente estudo por espécie de micoplama não puderam ser correlacionados com os dados obtidos por Cadman et al. (1994), pois os seus resultados não foram mostrados desta forma.

A frequência da ocorrência obtida por Cadman et al. (1994) e as obtidas neste trabalho demonstram que avestruzes são susceptíveis a infecção por *Mycoplasma* spp. Resultados obtidos por Ley et al. (2000) em um levantamento sorológico em 163 avestruzes em idade de abate (10 a 12 meses) utilizando a técnica de aglutinação rápida em placa para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* nos Estados de Ohio e Indiana nos Estados Unidos da América (USA), demonstraram 100% de animais não reagentes.

Os resultados obtidos no presente estudo quando comparados com os obtidos por Cadman (1994) e Ley et al. (2000) demonstram a presença de propriedades com animais reagentes e propriedades consideradas livres em períodos de tempo e regiões geográficas distintas, onde condições sanitárias e epidemiológicas específicas para estas regiões e criações, tiveram papel fundamental para os resultados obtidos.

A transmissão por contato é a principal forma de contágio para Micoplasmose em aves, sendo esta hipótese a mais coerente para explicar o contágio ocorrido.

Criadores nas fases iniciais da implantação dos seus plantéis, compraram animais não testados para detecção da presença de *Mycoplasma* spp. O diagnóstico direto do agente através de isolamento ou a sua detecção por PCR não são no momento muito utilizados para testar animais antes da compra (LEY et al. 2000).

A criação de galinhas “caipiras” livremente entre os avestruzes ocorreu em algumas propriedades, decorrente do desconhecimento de alguns proprietários do risco desta conduta para com a criação de avestruzes como foi demonstrado por Pereira et al. (2005), que detectou anticorpos anti-*Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em 63,8% de 160 amostras de soros de galinhas “caipiras” na região rural do Município de Uberlândia MG, e concluiu que a manutenção de galinhas “caipira” próximo à criação industrial de aves é um fator de risco da micoplasmose.

O diagnóstico definitivo faz-se necessário e inclui o isolamento do agente através da cultura bacteriológica ou a sua detecção por outros métodos como ELISA de captura e PCR, para que se possa implementar medidas profiláticas como indicadas por Feberwee et al. (2005).

A salmonelose representa risco para a saúde pública e a sanidade animal e esta diretamente correlacionada com a segurança alimentar dos produtos de origem animal. Estudos visando efetuar o diagnóstico definitivo para esta doença, são importantes porque detectam portadores e medidas de controle podem ser tomadas. Nos animais em que ocorreram a detecção de anticorpos anti-salmonela recorreu-se a pesquisa bacteriológica com o intuito de isolar *Salmonella* spp.(ANTUNES et al., 2003).

Optou-se pela metodologia do duplo enriquecimento em caldo tetrionato de sódio seguido do plaqueamento em meio SS e XLT4, pois os resultados obtidos por

Nascimento et al. (2000) foram favoráveis a esta metodologia quando comparado com os meios Rappaport – Vassialidis e Caldo selenito-cistina.

A pesquisa de *Salmonella spp.* em 100 suabes de avestruzes reprodutores apresentou resultado negativo para o isolamento de *Salmonella spp.*

O emprego da técnica do isolamento bacteriológico de *Salmonella spp.* a partir de carcaças ou suabes de cloaca de avestruzes conduziu ao isolamento de *Salmonella spp.* como descrito por Ley et al. (2001), Medeiros (2002), Marinho, Meirele e Souza (2004) e Ribeiro et al. (2005) no Estado de São Paulo e EUA .

Os resultados obtidos por Medeiros (2002), Marinho, Meireles e Souza (2004), Ribeiro et al. (2005), e Ley et al. (2001) nos levam a suspeitar na baixa ocorrência de *Salmonella spp.* nas criações testadas no presente estudo no momento das colheitas dos suabes.

Pode influenciar no isolamento de *Salmonella spp.* o tratamento com antibióticos para outras doenças e o uso de probióticos mas anticorpos detectáveis permanecem como os observados no presente estudo. A competição exclusiva causada por outras bactérias como a promovida pelo uso de probióticos nas rações que favorecem o controle das *Salmonella spp.* em populações de aves afetadas, sendo este último procedimento utilizado pelos criadores de avestruzes visnado a prevenção da enterotoxemia causada por bactérias do gênero *Clostridium sp.* (CHARLTON et al., 2005; EDEL, 1994; GAST; GUARD-BOULDIN; HOLD, 2005; JOUY et al., 2005; KANASHIRO et al. 2005).

Os resultados obtidos levam a necessidade de se aprofundar os estudos sobre o impacto da salmonelose na criação de avestruzes e a relação com a doença em seres humanos, principalmente na possibilidade da transmissão através de alimentos originados a partir de avestruzes contaminados por *Salmonella spp.*

Algumas medidas já foram tomadas pelo Ministério da Agricultura para normatizar a criação de avestruzes no Brasil, contempladas pela Instrução Normativa Conjunta nº 2 de 21 de fevereiro de 2003 que preconiza a sorologia de reprodutores e métodos de detecção de portadores através do isolamento bacteriológico e a PCR, realizados de forma periódica para a tomada de medidas profiláticas e de controle da *Salmonella* sp.

Desde o início da criação de avestruzes no Brasil, decorrente de medidas impostas no período de importação, a rastreabilidade teve e tem importante papel, pois todos os avestruzes nascidos em incubatórios no Brasil são identificados pela colocação de “chip” identificador na primeira semana de vida. Este procedimento permite a tomada de importantes medidas profiláticas e de controle no aparecimento de eventuais focos de doenças.

Os resultados obtidos nos levantamentos sorológicos abrem perspectivas para a necessidade de se aprofundar o conhecimento do comportamento destes patógenos na criação de avestruzes. A detecção de anticorpos anti-leptospira em avestruzes levanta a necessidade da realização do diagnóstico direto destes agentes nesta população e determinar a importância deste achado na epidemiologia desta doença. A detecção de rotavírus de origem bovina nesta espécie, além do achado inédito, levanta a questão da transmissão interespecies destes agentes, não prevenida de forma adequada na implantação dos plantéis no país.

7 CONCLUSÃO

- Nas fezes de filhotes de avestruzes foi detectada a presença de rotavírus.
- A análise da migração eletroforética do dsRNA foi compatível com rotavírus do sorogrupo A.
- Foi possível detectar os genótipos G[6], G[10], P[1] e P[7].
- Foram detectados anticorpos anti-rotavírus em 10 amostras de soros colhidos de avestruzes reprodutores.
- Não foram detectados anticorpos específicos anti-vírus da Encefalomielite Equina dos tipos Leste e Oeste.
- Não foram detectados anticorpos específicos anti-vírus da Influenza A.
- Foram detectados anticorpos específicos para 9 sorovares sendo Shermani (8/128=6,2%), (Butembo (7/128=5,4%), Pomona (4/128=3,1%), Hardjo (4/128=3,1%), Sentot (4/128=3,1%), Bratislava (2/128=1,5%), Hardjo (2/128=1,5%), Panama (2/128=1,5%), Bataviae (1/128=0,78%) e Casteloni (1/128=0,78%). de *Leptospira spp.*
- Foram detectados anticorpos específicos para *Salmonella pullorum* em 7 (7/9=77,7%) das propriedades pesquisadas e a frequência de ocorrência de animais reagentes variou de 0 a 20% % por propriedade, sendo 9,3% a frequência de ocorrência no total de amostras pesquisadas.
- Foram detectados anticorpos específicos para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. em 7 (7/9=77,7%) das propriedades pesquisadas e a frequência de ocorrência de animais reagentes variou de 0 a 83% % por

propriedade, sendo para *Mycoplasma gallisepticum* 8,2% e para *Mycoplasma synoviae* 26,2% a frequência de ocorrência no total de amostras pesquisadas.

- Não foram detectadas através do isolamento bacteriano amostras de *Salmonella spp.* em suabes de cloaca de reprodutores.

REFERÊNCIAS

ACAB disponível em :<<http://www.acab.org.br/estruturacultura/>> Acessado em 21 out. 2005.

ADAH, M. I.; ROHWEDDER, A.; OLEALEYLE, O. D.; DUROJAIYE, O. A.; WERCHAU, H. Further characterization of field strains of rotavirus from Nigeria VP4 genotype P6 most frequently identified among symptomatically infected children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 43, n. 5, p. 267-274, 1997.

ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 3-13, 2000.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMULLER, E. A.; BRITO, B. G. E.; MÉDICI, K. C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, n. 1, p. 5-11, 1999.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C.; SILVA, C. A.; FREIRE, R. L.; BARROS, A. R.; BARREIROS, M. A. B.; MULLER, E. E. Ocorrências de Escherichia coli, rotavírus, picobirnavírus e Cryptosporidium parvum em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 5-7, 1994.

ALFIERI, A. A.; RESENDE, M.; CONTI, L. E.; ALFIERI, A. F. Evidências do envolvimento do rotavírus nas diarreias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 4, p. 291-300, 1991.

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; FREITAS, J. C.; BARROS, A. R.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 167-173, 2004.

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; RESENDE, J. S.; RESENDE, M. Atypical rotavirus infections among broiler in chicken. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, p. 81-82, 1989a.

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; RESENDE, M.; RESENDE, J. S.; Detection and propagation of avian enteric reovirus in chicken. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, p. 493-501, 1989b.

* De conformidade com a NBR 6023.

ALLWRIGHT, D.M.; BURGER, W. P.; GEYER, A.; TERBLANCHE, A. W. Isolation of an Influenza A virus from ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Pathology**, v. 22, p. 59-65. 1993.

ANRAKU, M. M.; DE FARIO, W. C.; TAKEYAMA, D. C. Avian influenza in wild Brazilian birds, I. Serological survey by means of immunodiffusion. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 292-296, 1971.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 97-103, 2003.

ARENAS, A.; CARRANZA, J.; PEREA, A.; MIRANDA, A.; MALDONADO, A.; HERMOSO, M. Type A *Influenza* viruses in birds in Southern Spain: serological survey by enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition tests. **Avian Pathology**, v.19, p. 539-546, 1990.

BALISH, M. F.; KRAUSE, D. C. Cytadherence and cytoskeleton. In: RAZIN, S.; ERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002, p. 73-90.

BANYAI, K.; GENTSH, J. R.; SCHIPP, R.; JAKAB, F.; BENE, J.; MELEGH, B.; GLASS, R. I.; SZUCS, G. Molecular epidemiology of human P[8], G9 rotavirus in Hungary between 1998 and 2001. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 791-801, 2004.

BARREIROS, M. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C.; LEITE, J. P. Na outbreak of diarrheia in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7], G3 and P[7], G5. **Veterinary Research Communications**, v.27, p. 505-512, 2003.

BARREIROS, M. A.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C.; LEITE, J. P.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of group A rotavirus form diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, n. 3, p. 104-109, 2004.

BARSOUM, I. S.; BOTROS, B. A.; MORCOS, M. B. Equine leptospirosis with some clinical observations. **Annals of Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 115-118, 1978.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; LIMA, F. S.; NETO, J. O. A. Soroprevalência de

leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 131 – 136, 2004.

BAÜMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; BOWE, F. A.; KUSTERS, J. G.; HOFFMANN, S.; HEFFRON, F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 61–68, 1996.

BAÜMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1862–1865, 1996.

BAÜMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, p. 279–283, 1996.

BELLINZONI, R.; MATTION, N.; VALLEJOS, L.; LA TORRE, J.L.; SCODELLER E.A.; Atypical rotavirus in chickens in Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 43, n. 1, p. 130-131, 1987.

BERGELAND, M. E.; McADARAGH, J. P.; STOTTZ, I. Rotaviral enteritis in turkey poults. In: Western Poultry diseases conference, 26., 1977, Poultry Health Symposium, 11., 1977, Davis CA. **Proceedings ...1977**. p. 129-130.

BICHLER, L. A.; NAGARAJA, K. V.; HALVORSON, D. A. *Salmonella enteritidis* in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 489-495, 1996.

BISHOP, R. F. Natural History of human rotavirus infections. In: KAPIKIAN, A. Z.; (Ed) **Viral infections of the gastrointestinal tract**, 2. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 131-167.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans*. serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1001-1003, 1989.

BOQVIST, S.; MONTGOMERY, J. M.; HURST, M.; THU, H. T. V.; OLSSON, E.; ENGVALL, E.; GUNNARSSON, A.; MAGNUSSON, U. *Leptospira* in slaughtered

fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 361-368, 2003.

BOWEN, G. S.; FRANCY, D. B. Surveillance, In: MONATH, T. P. (Ed.). **St. Louis encephalitis**. Washington: American Public Health Association, 1980, p. 477-499.

BRADBURY, J. M. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. **British Poultry Science**, v. 46, n. 2, p. 125-136, 2005.

BRANDÃO, A. P.; CAMARGO, E. D.; SILVA, E. D.; SILVA, M. V.; ABRÃO, R. V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3138-3142, 1998.

BRANDÃO, P. E.; CORTEZ, A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; HOMEM, V. S. F.; RODRIGUEZ, C. A. R.; JEREZ, J. A. Soroprevalência de anticorpos anti-rotavírus do soro grupo A em bovinos de uma fronteira pioneira na Amazônia Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.18-20, 2002.

BRANDLING-BENETT, A. D.; PINHEIRO, F. Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing? **Emerging Infectious Diseases**, v.2, p. 59-61, 1996

BRITO, W.M.E.D. **Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavírus bovino do Estado de Goiás**. São Paulo. 1998, 211 p. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BRITO, W. M. E. D.; MUNFOR, V.; VILLAÇA, A. M.; CARUZO, T. A. R.; RACZ, M. L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herd in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 140-145, 2000.

BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza virus in pigs. **Veterinary Microbiology**, n. 74, p. 29-46, 2000.

BROWN, T. P.; ROBERTS, W.; PAGE, R. K. Acute Hemorrhagic enterocolitis in ratites: Isolation of eastern equine encephalomyelitis virus and reproduction of the diseases in ostriches and turkey poults. **Avian diseases**, n. 37, p. 602-605, 1993.

BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Caracterização eletroforética de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo. **ARS Veterinária**, v. 14, p. 193-200, 1998.

BUZINARO, M. G.; MISTIERI, A. A. B.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA, S. I.; REGITANO, L. C. A.; JEREZ, J. A. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 193-200, 2003.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; ZHOU, R.; DAVELLAR, F.; MASON, P. R. A. Serosurvey using Enzyme-linked Immunosorbent Assay for antibodies against Poultry Pathogens in Ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. **Avian Diseases**, v. 38, p. 621-625, 1994.

CALISHER, C. H.; FREEMOUNT, H. N.; VESELY, W. L.; EL-KAFRAWI, A. O.; MAHMUD, M. I. A.; Relevance of detection of immunoglobulin M Antibody Response in Birds Used for Arbovirus Surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 770-774, 1986.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. In: MONATH, T. P. (Ed.). Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc., 1988 p. 19-57.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; FOSTER, P. J.; PALLANSCH, M.; ROEHRIG, J.T. Identification of an antigenic subtype of Eastern Equine Encephalitis Virus Isolated from a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 373-374, 1990.

CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. An update on avian influenza in poultry. **International Congress series**, n. 1263, p. 741-744, 2004.

CAPUA, I.; MUTINELLI, F.; TERREGINO, C.; CATTOLI, G. Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches farmed in Italy. **Veterinary Record**, v. 18, p. 356, 2000.

CARRER, C. C.; KORNFIELD, M. E. Aspectos de importância na produção racional de avestruzes (*Struthio camelus*). **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 46-51, 1999.

CASTRUCCI, M. R., DONATELLI, I., SIDOLI, L., BARIGAZZI, G., KAWAOKA, Y., WEBSTER, R. G. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **Virology**, v. 193, p. 503-506, 1993.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlon – Wisconsin and Illinois. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 47, p. 585-588, 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of acute febrile illness among participants in ecochallenge sabah 2000 Malaysia. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 49, p. 816-817, 2000.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Brief report: Leptospirosis after flooding of a university campus- - Hawaii, 2004. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 55, n. 5, p. 125-127, 2006.

CHEN, C. M.; HUNG, I.; BRIDGER, J. C.; McCRAE, M. A. Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. **Lancet**, n. 8464, p. 1123-1124, 1985.

CHIU, H. C.; SU, L. H.; CHU, C. *Salmonella enterica* serotype choleraesuis: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 311-322, 2004.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 976-980, 1973.

COLLINSON, S. K.; DOIG, P. C.; DORAN, J. L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 12–18, 1993.

COLLINSON, S. K.; EMÖDY, L.; MÜLLER, K. H.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. Purification of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4773–4781, 1991.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 189-193, 2004.

CRANS, W. J. Failure of chickens to act as sentinels during an epizootic of eastern equine encephalitis in southern New Jersey, USA. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, p. 626-629, 1998.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O. R.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and Microscopic Agglutination Test (MAT) en the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 731-734, 1999.

DAHER, E. F.; BRUNETTA, D. M.; SILVA JÚNIOR, G. B.; PUSTER, R. A.; PATROCÍNIO, R. M. S. V. Pancreatic involvement in fatal human leptospirosis: clinical and histopatological features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 307-313, 2003.

DARWIN, H. K.; MILLER, V. L. Molecular basis of interation of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical of Microbiology Review**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DE MARCO, M. A.; CAMPITELLI, L.; FONI, E.; RAFFINI, E.; BARIGAZZI, G.; DELOGU, M.; GUBERTI, V.; DITRANI, L.; TOLLIS, M.; DONATELLI, I. Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992-1998): is there a host restricted circulation of Influenza viruses in sympatric ducks and coots. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 197-208, 2004.

DHILON, A. S.; ALISANTOSA, B.; SHIVAPRASAD, H. L.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of Salmonella Enteritidis Phage Types 4, 8, and 23 in Broiler Chicks. **Avian Diseases**, v. 43, p. 506-515, 1999.

DHILON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; ROY, P.; ALISANTOSA, B.; SCHABERG, D.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of Environmental Origin Salmonellas in Specific Pathogen-Free Chicks. **Poultry Science**, v. 80, p. 1323-1328, 2001.

DOLAN, K.; TWIST, E. M.; HORTON-SLITH, P.; FORRER, C.; BELL JR, C. M.; PLOTKIN, A. S.; CLARK, H. F. Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, p. 753-758, 1985.

DUNCAN, M. J.; MANN, E. L.; COHEN, M. S.; OFEK, I.; SHARON, N.; ABRAHAN, S. N.; The Distinct Binding specificities Exhibited bi Enterobacterial Type 1 fimbriae are Determinated by their Fimbrial Shafts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 37707-37716, 2005.

EDEL, W. *Salmonella enteritidis* eradication programme in poultry breeder flocks in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 171-178, 1994.

ELLIS, A.; HOVIND-HOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCH-ANDERSEN, A. Morphological changes upon sub culturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene**, v. 255, p. 323-335, 1983.

ELSCHNER, M.; SCHRADER, C.; HOTZEL, H.; PRUDLO, J.; SACHSE, K.; EICHHORN, W.; HERBSI, W.; OTTO, P. Isolation and molecular characterization of equine rotaviruses from Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 123-129, 2005.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; HOWLEY, D. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, R.; STRAUS, S. E.; KNIPE, D. M. (Ed.). **Virology**, 3 ed. v.1, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 1631-1632. 1996.

EVERARD, J. D.; EVERARD, C. O. R. Leptospirosis in the Caribbean. **Revista de Medicina e Microbiologia**, v. 4, p.114–122, 1993.

FAINE, S; **Leptospira and Leptospirosis**. Boca Raton Fla USA: CRC Press, 1994, p. 353.

FAINE, S; ADLER, B; BOLIN, C; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2: ed. Melbourne: Medisci, 1999. 272 p.

FEBERWEE, A.; MEKKES, J. J.; WIT, E. G.; HARTMANN, A.; PIJPERS, A. Comparison of Culture, PCR and Different Serologic Tests for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infections. **Avian Diseases**, v. 49, p. 260-268, 2005.

FENER, W. T.; MISKUFF, R. L.; YOLKEN, R. H.; ONDERFECHT, S. L; Comparison of methods for detection of serum antibodies to murine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1364-1369, 1987.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Samonella enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; DA ROSA, A. T.; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 232-235, 2000.

FODHA, I.; BOUMAIZA, A.; GHOUIKHA, A.; DEWAR, J.; ARMAH, G.; GEYER, A.; TRABELSI, A.; STEELE, A. D. Detection of group A rotavirus strains circulating in calves in Tunisia. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 49-50, 2005.

FUKUSHO, A.; SHIMIZU, Y.; ITO, Y. Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. **Archives of Virology**, v. 69, n. 1, p. 49-60, 1981.

GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLD, P. S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella heidelberg*. **Avian Diseases**, v. 49, p. 382-386, 2005.

GAST, R. K.; PORTER, R. E.; HOLD, P. S. Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella enteritidis* in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Disease**, v. 41, n. 1, p. 195-202, 1997.

GATTI, M. S.; RICCI, L. C.; SERAFIN, M. B.; DE CASTRO, A. F. Incidência de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), rotavírus e *Clostridium perfringens* de casos de diarreia em crianças, na região de Campinas, SP, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 31, p. 392-398, 1989.

GREGORI, F. **Diarréia Neonatal: desenvolvimento e avaliação de um método de Elisa para a detecção de rotavírus a partir de matéria fecal**. 1999. 113 p. Tese (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; REIS, M. G.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to Leptospirosis in humans. **Infections and Immunology**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

HAMMOND, G. W.; AHLUWALIA, G. S.; KLISKO, B.; HAZELTON, P. R. Human Rotavirus Detection by Counterimmunoelectrophoresis Versus Enzyme Immunoassay and Electron Microscopy After Direct Ultracentrifugation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 439-441, 1984.

HARDY, J. L. 1988. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: MONATH, T. P. (Ed.).CRC Press, Inc., Boca Raton , Fla, USA. **The arboviruses: epidemiology and ecology**. 1988. p. 87-126.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F. OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavírus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p. 473-477, 1982.

HOFER, E.; SILVA FILHO, J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p. 5-62, 1997.

HOFER, E.; SILVA FILHO, J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias – primas de rações e de rações para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p. 21-27, 1998.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Vírus. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n.1, p.129-140, 2001.

HÜTTNER, M. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, R. M.; Pneumonia por leptospirose. **Journal of Pneumology**, v. 28, n. 4, p. 229-232, 2002.

IVERSSON, L. B.; COIMBRA, T. L. M.; Encefalite na região do vale da Ribeira, São Paulo, Brasil, no período pós-epidêmico de 1978 e 1983. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 323-332, 1984

JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J. A. N.; DURIGON, E. L.; Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. **Revista da Microbiologia**, v. 18, p. 201-204, 1987.

JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J. A. N.; DURIGON, E. L.; Tipos eletroforético de rotavírus bovino. **Revista da Microbiologia**, v. 20, p. 254-257, 1989.

JONHSON, R. C.; FAINE, S.; **Leptospira** In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Willians & Wilkins, Baltimore, Md.1984, v. 1, p. 62-67.

JOHNSTON, R. E.; PETERS, C. J.; **Alphaviruses**. In: B. N. FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; Fields Virology, 3. ed. (Ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996, p. 843-898.

JORGENSEN, P. H.; NIELSEN, O. L.; HANSEN, H. C.; MANVELL, R. J.; BANKS, J.; ALEXANDER, D. J. Isolation of influenza A virus, subtype H5N2, and avian paramyxovirus type 1 from a flock of ostriches in Europa. **Avian Pathology**, n. 27, p. 15-20, 1998.

JOUY, E.; PROUX, K.; HUMBERT, F.; ROSE, V.; LALANDE, F.; HOUDAYER, C.; PICAULT, J. P.; SALVAT, G. Evaluation of a French ELISA for the detection of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* typhimurium in flocks of laying and breeding hens. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 71, p. 91-103, 2005.

KANASHIRO, A. M.; STOPPA, G. F. Z.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Serovar of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 7, n. 3, p. 195-198, 2005.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; CHANOCK, R. M.; HIRSH, M. S.; JOSEPH, L. M.; MONATH, T. P.; ROIAMAN, B. (Ed.). **Virology**, 2. ed. New York: Raven Press, 1990. p. 1353-1404.

KAUFMANN, A. F.; WEYANT, R. S. Leptospiraceae. In: MURRAY, P. R.; (Ed.). **Manual of clinical microbiology**, 6. ed. Washington: ASM Press, 1995. p. 621-625.

KAZAMI, A.; WATANABE, H.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OGAWA, Y.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, Y. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma Prefectures of Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 8, p. 735-737, 2002.

KLEVEN, S. H.; YODER JR., H. W. Mycoplasmatosis. In: PUCHASE, H. G.; ARP, L. H.; DOMERMUTH, C. H.; PEARSON, J. E.; (Ed.). **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 3 ed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists. 1989. p. 57-62.

KOSTOUROS, E.; SIU, K.; FORD-JONES, E. L.; PETRIC, M.; TELLIER, R. Molecular characterization of rotavirus strains from children in Toronto, Canada. **Journal of Clinical Virology**, v. 28, n. 1, p. 77-84, 2003.

KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; COIMBRA, T. L. M.; CUNHA, E. M. S.; QUEIROZ, L. H.; MACRUZ, R.; NAGAMORI, A. H. Isolamento e identificação do vírus da encefalomielite eqüina, tipo leste, em eqüinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 59, p. 37-41, 1992.

KURTZ, J.; MANVELL, R.J.; BANKS, J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. **Lancet**, v. 348, p. 901-902, 1996.

LAMBERT, A.J.; MARTIN, D. A.; LANCIOTTI, R. S.; Detection of North American and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 379-385, 2003.

LAMBERT, L. C.; TRUMMELL, H. Q.; SINGH, A.; CASSELL, G. H.; BRIDGES, R. J.; *Mycoplasma pulmonis* inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. **Infection and Immunology**, v. 66, p. 272-279, 1998.

LANGONI, H. Isolamento e testes de placas para uma amostra de rotavírus bovino. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, p. 225-230, 1988.

LEGROTTAGLIE, R.; RIZZI, R.; AGRIMI, P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. **Compendium of Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 205-210, 1997.

LEVETT, P. N. *Leptospirosis*. **Clinical of Microbiology Review**, v.14, n. 2, p.296-326. 2001.

LEY, E. C.; MORISHITA, T. Y.; BRISHER, T.; HARR, B. S. Prevalence of Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli on Ostrich Carcasses and the susceptibility of ostrich-origin E. coli isolates to various antibiotics. **Avian Diseases**, v. 45, p. 696-700, 2001.

LEY, E. C.; MORISHITA, T. Y.; HARR, B. S.; MOHAN, R.; BRISKER, T. Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. **Avian Diseases**, n. 44, p. 989-992, 2000.

LINHARES, C. A. Epidemiologia da infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 3, n. 16, p. 629-646, 2000.

LINHARES, C. A. Rotavírus infection in Brazil: Epidemiology, immunity, and potential vaccination. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 284-293, 1997.

LINHARES, C. A.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MULLER, G.; PETERS, D. [Duovirus (rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report)]. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 19, n. 4, p. 278-279, 1977.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON III, P. B.; TULLY, J. G.; SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. **Modern Pathology**, v. 6, p. 276-280, 1993.

LOPES, O. S.; SACHETTA, L. A. Epidemiological studies on Eastern Equine Encephalitis virus in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 16, n. 5, p. 253-258, 1974.

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; NURMBERGER JR., R.; VASCONCELLOS, S. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 194-200, 2004.

MANCINI, D. A. P.; MENDONÇA, R. M. Z.; CIANCIARULLO, A. M.; KOBASHI, L. S.; TRINDADE, H. G.; FERNANDES, W.; PINTO, J. R. Influenza em animais heterotérmicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n. 3, p. 204-209, 2004.

MARINHO, A. A.; MEIRELES, M. V.; SOUZA, A. V. G. Determinação da microflora do trato gastrointestinal de avestruzes (*Struthio camelus*) criados na região noroeste do Estado de São Paulo, submetidos à necrópsia. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 71, n. 3, p. 267-271, 2004.

MARKOWSKA, D. I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKIZ, Z.; PEJSKAK, Z. Evaluation of different methods (elisa, if, em, page) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Compendium of Immunological Microbiology infections**, v. 19, n. 3, p. 219-232, 1996.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; CIRLET, M.; ITURRIZA-GÓMARRA, M.; LORUSSO, E.; DE GRAZIA, S.; ARISTA, S.; DECARO, N.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; LAVAZZA, A.; BASELGA, R.; BUONAVOGLIA, C. Relationship among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v. 344, p. 509-519, 2006.

MASCARENHAS, J. D.; ARIAS, C. F.; PADILLA-NORIEGA, L.; LOPEZ, S.; GUSMÃO, R. H.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, C. A. Characterization of rotavirus strains with unusual electrophoretic profiles. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 771-774, 1997.

MATSUI, S. M.; MACKOW, E. R.; GREENBERG, H. B. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. **Advances in Virus Research**, v. 36, n. 81, p. 181-214, 1989.

MAUNULA, L.; BONSDORFF, C. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of Rotavirus: Analysis of finnish rotavirus strain. **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 11793-11800, 2002.

MCNULTY, M. S.; ALLAN, G. M.; McCracken, R. M.; Experimental Infection of Chickens with Rotaviruses: Clinical and Virological Findings. **Avian Pathology**, n. 12, p. 45-54, 1983.

MCWHORTER-MURLIN, A. C.; HICKMAN-BRENNER, F. W. 1994. Identification and serotyping of *Salmonella* and an update of the Kauffmann-White scheme. Atlanta, GA: 1994. Centers for Disease Control and Prevention.

MEDEIROS, A. A. **Estudo da microbiota intestinal de avestruz do interior do Estado e São Paulo: avaliação "in vitro" de algumas espécies bacterianas para a utilização de probióticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MINOR, L. L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only 7 species of the genus *Salmonella*. **International of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 465-468, 1987.

MO, I. P.; BRUGH, M.; FLETCHER, O. J. C.; ROWLAND, G. N.; SWAYNE, D. E. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. **Avian Diseases**, n. 41, p. 125-36, 1997.

MOCH, R. W.; EBNER, E. E.; BARSOUM, L. S.; BOTROS, B. A. Leptospirosis in Ethiopia: a serological survey in domestic and wild animals. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 38-42, 1975.

MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer flocks. **Avian Diseases**, v. 31, p. 477-482, 1987.

MOORE, C. G.; MCCLEAN, C. J.; MITCHELL, R. S.; NASCI, T. F.; TSAI, C. H.; CALISHER, A. A.; MARFIN, P. S.; MOORE, P. S.; GUBLER, D. I. Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. **Center for Diseases Control**, v.1, p. 64, 1993.

MURPHY, A. F.; GIBBS, E. P.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**, 3. ed. cidade Hardcover, 1999. p 615.

MYERS, K. P.; OLSEN, C. W.; SETTERQUIST, S. F.; CAPUANO, A. W.; DONHAM, K. J.; THACKER, E. L.; MERCHANT, J. A.; GRAY, G. C. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 14-20, 2006.

NAKAMURA, M.; TAIRA, K.; ITOKAZU, K.; KUDARA, J.; ASATO, R.; KISE, T.; KOIZUME, N.; Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa main Island. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 68, n. 1, p. 83-85, 2006.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmatose. In: MACARI, M.; BERQUIERI, A.; (Ed.). **Doenças das aves**, Campinas: FACTA, 2000. 800 p.

NASCIMENTO, M. S.; BERCHIERI, J. R. A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparison of different enrichment broth and plating media used to isolating *salmonella* from chicken carcasses and poultry faeces samples. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 85-91, 2000.

NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; AMBON, M. Influenza. **LANCET**, v. 363, p. 1733-1745, 2003.

OFFICE INTERNATIONAL OF EPIZZOTIES; **Manual of diagnostics tests and vaccines of terrestrial animals**, Geneva, Switzerland; 2004.

OLIVEIRA, R. C.; FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; SOUZA, E. M.; DELBEM, A. C. B.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; BALARIM, M. S.; REIS, A. C. F.; BATISTA, T. N.; VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 111-113, 2005a.

OLIVEIRA, G. S.; SCHIAVO, P.A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Prevalência de anticorpos para o vírus da Influenza equina, subtipo H₃N₈, em equídeos apreendidos no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1213-1215, 2005b.

OLSEN, A. R.; HAMMACK, T. S. Isolation of Salmonella spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 958-960, 2000.

OLSON, J. G.; SCOTT, T. W.; LORENZ, L. H.; HUBBARD, J. L. Enzyme Immunoassay for detection of antibodies against Eastern Equine Encephalomyelitis Virus in Sentinel Chickens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1457-1461, 1991.

PANIGRAHY, B.; SENNE, A. D.; PEARSON, J. E. Presence of Avian Influenza Virus (AIV) Subtypes H5N2 and H7N1 en Emus (*Dromarius novaehollandiae*) an Rheas (*Rhea americana*): Virus isolation and Serologic Findings. **Avian Diseases**, n. 39, p. 64-67, 1995.

PAPAZISI, L.; GORTON, T. S.; KUTISH, G.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NGUYEN, D. K.; SWARTZELL, S.; MADAN, A.; MAHAIRAS, G.; GEARY, S. J. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R_{low}. **Microbiology**, v. 149, p. 2307-2316, 2003.

PARMA, A. E.; FERNANDEZ, A. S.; SANTISTEBAN, C. G.; BOWDEN, R. A.; CERONE, S. I. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, p. 181-185, 1987.

PEIRIS, M.; YUEN, K. Y.; LEUNG, C. W.; CHAN, K. H.; IP, P. L. S.; LAI, R. W. M.; ORR, W. K.; SHORTRIDGE, K. F. Human infection with influenza H9N2. **Lancet**, v. 354, p. 916-917, 1999.

PEREIRA, M. S. *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em galinhas "caipiras". **Avicultura Industrial**, n.1133, p. 2005.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (nº.45) to the Kauffmann – White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 173-174, 2003.

PROUX, K.; HUMBERT, F.; JOUY, E.; HOUDAYER, C.; LALANDE, F.; OGER, A.; SALVAT, G.; Improvements required for the detection of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum*. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 151-157, 2002.

RABSCH, W.; HELM, R. A.; EISENSTARK, A.; Diversity of phage types among archived cultures of the demerec collection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 664-669, 2004.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D. W.; CORNER, R. J.; CINCO, M.; MARSHALL, R. B. DNA relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. **Infectious Journal Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 231-235, 1992.

RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R. C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 1-8, 2000.

RANGEL FILHO, F. B.; LIMA, J. G. P. Rotavírose diarreica em bezerros tipo leiteiro no Estado do Espírito Santo, Brasil. I. Estudos de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 35-37, 1987.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 138, p. 407-422, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of micoplasmas. **Microbiology Molecular Biological Review**, v. 62, p. 1094-1156, 1998.

REISEN, W. K.; MONATH, T.P. 1988. Western equine encephalomyelitis, In: MONATH, T. P.; (Ed.). **The arboviruses: epidemiology and ecology**, Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988. p. 89-137.

RIBEIRO, S. A. M.; ORSI, M. A.; DORETTO JR., L.; FERRATI, A. R.; MENDONÇA, A. O.; ALBIERII, S. C.; YOCHIDA, L. T.; REISCHAK, D.; REIS, E. F.; BERCHIERI JR., A. Isolamento de salmonelas de avestruzes importadas no período de Nov/99 a Set/02. **Avicultura Industrial**, n. 1130, p. 2005.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; GREGORI, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in MA₁₀₄ cells

using different trypsin concentrations. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 71, n. 4, p. 437-441, 2004.

ROTTEM, S. Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells, In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic, 2002. p. 391-401.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; SCHABERG, D. M.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of Different Serogroups of Avian Salmonellae in Specific-Pathogen-Free Chickens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 922-937, 2001.

SAIF, L. J.; TERETT, L. A.; MILLER, K. L.; CROSS, R. F. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1277-1282. 1988.

SAN JUAN, C. S.; BELLINZONI, R. C.; MATTION, N.; LATORRE, J.; ACODLLER, E. A. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. **Research in Veterinary Science**, n. 41, p. 270-272, 1986.

SCOTT, T. W.; WEAVER, S. C. Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission. **Advances in Virus Research**, v. 37, p. 277-328, 1989.

SOARES, P. B. M.; DEMÉTRIO, C.; SANFILIPPO, L.; KAWANOTO, A. H. N.; BRENTANO, L.; DURIGON, E. L. Standardization of duplex RT-PCR for the detection of *Influenza A* and Newcastle disease viruses in migratory birds. **Journal of Virological Methods**, v. 123, p. 125-130, 2005.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary Mannanligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 205-211, 2000.

STALLKNECHT, D. E. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN INFLUENZA. 4., 1998, Athens, Georgia. **Proceedings...** p. 61-69.

STRAUSS, H. J.; STRAUSS, E. G. The Alphavirus: gene expression, replication and evolution. **Microbiology Reviews**, v. 58, n. 3, 1994.

SUBBARAO, K.; KLIMOV, A.; KATZ, J.; REGNERY, H.; LIM, W.; HALL, H.; PERDUE, M.; SWAYNE, D.; BENDER, C.; HUANG, J.; HEMPHILL, M.; ROWE, T.; SHAW, M.; XU, X.; FUKUDA, K.; COX, N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. **Science**, v. 279, p. 393– 396, 1998.

SUZUKI, T. TAKAHASHI, T.; GUO, C. T.; HIDARI, K. I. P.; MIYAMOTO, D.; GOTO, H.; KAWAOKA, Y.; SUZUKI, Y. Sialidase activity of *Influenza A* virus in an endocytic pathway enhances viral replication. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 11705-11715, 2005.

SWAYNE, D. E.; BECK, J. R.; PERDUE, M. L.; BRUGH, M.; SLEMONS, R. D. Assessment of the ability of ratite-origin influenza viruses to infect and produce disease in Rheas and Chickens. **Avian Diseases**, n. 40, p. 438-447, 1996.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; Segmented doubled-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal Microbiology**, n. 34, p. 348-353, 2003.

TARSHIS, M.; SALMAN, M.; ROTTEM, S. Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with *M. caprolium*. **Biophysical**, v. 64, p. 709-715, 1993.

TAUSCHER, G. I.; DESSELBERGER, V. Viral determinants of Rotavirus pathogenicity in pigs: Production of reassortants by asynchronous coinfection. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 853-857, 1997.

TEIXEIRA, J. M.; CAMARA, G. N.; PIMENTEL, P. F. V.; FERREIRA, M. N. R.; FERREIRA, M. S. R.; ALFIERI, A. A.; GENTSCH, J. R.; LEITE, J. P. G. Human group C in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 31, p. 1397-1403, 1998.

THEIL, K. W.; BOHL, E. H.; SAIF, L. J. Techniques for rotaviral propagation. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 73, p. 548-5, 1978.

THEIL, K. W.; REYNOLDS, D. L.; SAIF, Y. M. Comparison of Immune electron microscopy and genome electropherotyping techniques for detection of turkey rotaviruses and rotaviruslike viruses in intestinal contents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 695-699, 1986.

TIMENETSKY, M. C.; SANTOS, N.; GOUVEIA, V. Survey of rotavírus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32, p. 2622-2624, 1994.

TODD, D.; MCNULTY, M. S. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in Polyacrylamide gels. **Avian Pathology**, n. 15, p. 149-159, 1986.

TOLLIS, M.; TRANI, D. Recent development in Avian Influenza research: Epidemiology and Immunoprophylaxis. **The Veterinary Journal**, n. 164, p. 202-215, 2002.

TREVEJO, R. T.; RIGAU-PEREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUÍM-GONZALEZ, C.; AMADOR, J. J.; de los REYES, J. O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S. R.; SHIEH, W. J.; McCLEAN, R. G.; NASCI, R. S.; WEYANT, R. S.; BOLIN, C. A.; BRAGG, S. L.; PERKINS, B. A.; SPIEGEL, R. A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage - Nicaragua, 1995. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 1457-1463. 1998.

TRUEBA, G. A.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4761-4768, 1992.

UIP, D. E.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. S. Diagnóstico precoce da Leptospirose por demonstração de antígenos através do exame imunohistoquímica em músculo da panturrilha. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 375-381, 1992.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicação Científica Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P.; KASLOW, D. C. Sporadic urban leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, p. 794-798, 1996.

WALKER, R. L. Micoplasmatose In: **Microbiologia veterinária** HIRSCH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.155.

WALRAVENS, M. J. F.; VANHEREWEGER, H.; LACQUET, F.; GODEFRIDIS, G.; KORGUIITS, G.; STEVENS, E.; MARIEN, G.; MOLENBEGHS, G. Counterimmuno-electrophoresis with serum perdiffusion: as improved method for the

detection and identification of antibodies against extractable nuclear and cytoplasmatic antigens. **Journal of Immunological Methods**, v. 201, p. 89-98, 1997.

WANI, S. A.; BHAT, M. A.; ISHAQ, S. M.; ASHRAFI MA BUCHH, A. S.; HAQ, M. Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 13-18, 2003.

WARD, L. R.; DE SA, J. D. H.; ROWE, B. A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiology and Infection**, v. 99, p. 291-294, 1987.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiology Review**, v. 56, p. 152-179, 1992.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In Vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infections and Immunology**, v. 68, p. 4238-4244, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leptospirosis worldwide,. **Weekly Epidemiology**, v.74, p. 237-242, 1999.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven now *Leptospira* species. **Inform Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ANEXO

9.1 SOLUÇÕES EMPREGADAS NAS REAÇÕES DE PAGE

Dissociador de RNA

Reagente	Quantidade
SDS 10%	3,0 mL
Upper TRIS 4x	1,25 mL
2-mercapto-etanol	0,5 mL
Glicerol	4,0 mL
Azul de bromofenol 0,5%	100 µl
Água bidestilada	q.s.p. 10,0 mL

Nota: para preparo do padrão, preparar mistura dissociante com 3g de uréia em substituição ao glicerol.

Acrilamida / bis-acrilamida (50/1,3)

Reagente	Quantidade
Acrilamida	50,0 g
Bis-acrilamida	1,3 g
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 mL

Lower TRIS 4x (1,5M TRIS/HCl; pH 8,8)

Reagente	Quantidade
TRIS (base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 mL

Upper TRIS 4x (0,5M TRIS/HCl;pH 6,8)

Reagente	Quantidade
TRIS (base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 6,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

Persulfato de amônio (20 mg/mL)

Reagente	Quantidade
Persulfato de amônio	20 mg
Água bidestilada	q.s.p. 1,0 mL

Gel de poliacrilamida *

	Quantidade de Reagente	
	Gel de empilhamento (3,5%)	Gel de corrida (7,5%)
Solução mãe de Acrilamida/Bisacrilamida*	0,14 mL	1,02 mL
Lower TRIS 4x	-----	1,75 mL
Upper TRIS 4x	0,5 mL	-----
H ₂ O bidestilada	1,3 mL	4,02 mL
Persulfato de amônio	50 µL	200 µL
TEMED	10 µL	10 µL

*Solução-mãe de acrilamida/bis-acrilamida a 50/1,3, com C=2,53% (crosslinking).

Solução estoque TRIS-glicina 4x para tampão de corrida

Reagente	Quantidade
TRIS (base)	12,0 g
Glicina	57,6 g
Azida sódica 10%	10, 0 mL
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL

Tampão de corrida

Reagente	Quantidade
TRIS-glicina 4x	60 mL
Água bidestilada	180 mL

Solução reveladora

Reagente	Quantidade
NaOH	3,75 g
Formaldeído (40%)	0,95 mL
Água bidestilada	q.s.p.125 mL

Nota: Adicionar o formaldeído quando o volume estiver próximo do volume total.,

9.2 SOLUÇÕES EMPREGADAS NAS REAÇÕES DE HÁ E HI

Alsever

Reagentes	Quantidade
Dextrose ($C_6H_{12}O_6$)	20,50 g
Cloreto de sódio (NaCl)	4,20 g
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$)	0,55 g
Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	8,00 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

P.B.S. (Solução Salina Tamponada) pH 7,2.

Reagentes	Quantidade
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	2,587 g
Fosfato dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	8,494 g
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Salina 0,85%

Reagentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

9.3 SOLUÇÕES EMPREGADAS NA CONTRAIMUNOELETROSMOFORESE

TRIS 10mM CaCl₂ 1,5 mM pH 7,3.

Reagentes	Quantidade
TRIS (hidroximetil)-aminometano	1,2114 g
CaCl ₂	0,1662 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Sacarose a 45%

Reagentes	Quantidade
Sacarose	45,0 g
TRIS 10mM CaCl ₂ 1,5 mM pH 7,3..	1.000 mL

TRIS $\mu=0,113$ pH 8,6

Reagentes	Quantidade
TRIS (hidroximetil)-aminometano	2,587 g
Acetato de sódio bihidratado	8,494 g
HCl	13,0 mL
Água bidestilada	1.000 mL

TRIS $\mu=0.06$ pH 8,6

Reagentes	Quantidade
TRIS $\mu=0,113$ pH 8,6	120 mL
Água destilada q.s.p.	80 mL

Agarose a 1%

Reagentes	Quantidade
Agarose	1,00 g
Timerosol	0,02 g
TRIS $\mu=0,06$ pH 8,6	1.00 mL

9.4 SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ISOLAMENTO VIRAL

Solução ativadora Viral (VAS)

Reagentes	Quantidade
Acetil Tripsina (pH 7,2)	1,5 mL
Meio de Eagle para manutenção	30 mL

Acetil-Tripsina pH=7,2 (20 mL)

Reagentes	Quantidade
NaCl	0,16 g
KCl	0,008 g
Na ₂ HPO ₄	0,0012 g
KH ₂ PO ₄	0,0012 g
Glicose	0,02 g
Tripsina em pó	2,0 g

Preparo:

- 1-Pipetar aproximadamente 12 mL de água deionizada em 1 frasco. Adicionar, sob agitação, os componentes na ordem indicada, exceto a tripsina, sempre aguardando a formação da solução antes de adicionar o componente seguinte.
- 2-Manter o frasco em geladeira até atingir 4° C.
- 3- Adicionar a tripsina e, após 10 minutos, sob agitação, medir o pH, ajustando-o para 7,2.
- 4- Completar o volume para 20 mL de água deionizada gelada.
- 5- Centrifugar 1.000 G por 1 hora, 4° C.
- 6- Decantar o sobrenadante e filtrar.
- 7- Efetuar o controle de esterilidade em ágar-sangue e Sabouraud.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)