

mais susceptíveis a parasitas intestinais e fungos de trato gastrointestinal, desta forma, o aumento de volume abdominal muitas vezes pode estar relacionado à dilatação de alças intestinais. Entre as aves adultas, a maioria dos diagnósticos estava relacionada ao trato reprodutor ou a tumor. O exame ultrassonográfico não conseguiu identificar a origem dos tumores, limitação atribuída tanto ao tamanho das aves como pela limitação que os sacos aéreos trazem para este exame. No entanto, calopsitas fêmeas adultas possuem elevado índice de problemas em sistema reprodutor ligados a ovo retido, ovo peritonite, cistos ovarianos ou de oviduto, salpingite e tumores em ovário e oviduto. Portanto, os casos analisados revelaram que nas aves filhotes predominaram quadros de enterites acompanhados de dilatação intestinal, enquanto que em calopsitas adultas fêmeas houve uma maior frequência de alterações ligadas ao sistema reprodutor. Esta casuística auxilia tanto o clínico quanto o ultrassonografista na presunção de possíveis diagnósticos em cavidade celomática de calopsitas.

**Palavras-chave:** Calopsitas. Ultrassonografia. Aumento de volume abdominal.

### SHIGA TOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI (STEC) IN PSITTACINE BIRDS: MOLECULAR CHARACTERIZATION, PHYLOGENETIC ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY

GIOIA-DI CHIACCHIO, ROSELY MARTINS<sup>1</sup>; CUNHA, MARCOS PAULO VIEIRA<sup>1</sup>; STURN, REGIANE MARQUES<sup>1</sup>; PEREIRA, CAMILA BUENO PACHECO<sup>2</sup>; MARTINS, FERNANDO HENRIQUE<sup>2</sup>; FRANZOLIN, MARCIA REGINA<sup>2</sup>; PIAZZA, ROXANE, MARIA FONTES<sup>2</sup>; GÓRNIK, SILVANA LIMA<sup>1</sup>; KNÖBL, TEREZINHA<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).
2. Instituto Butantan – Laboratório de Bacteriologia.

**Introduction:** Among the psittacidae bred as pets, the cockatiels (*Nymphicus hollandicus*), agapornis (*Agapornis* spp.), and budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) stand out, because they keep people company, and have a colorful plumage, although the zoonotic risks are little known. *Escherichia coli* (*E. coli*) is a facultative anaerobic Gram-negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. Some *E. coli* pathotypes are considered as diarrheagenic, and the molecular techniques are useful in identifying the genetic traits of virulence. The agent does not belong to the microbiota of psittacidae. This study investigated the presence of STEC (diarrheagenic Shiga toxin-producing *E. coli*) in the feces from cockatiels, budgerigars, and agapornis. **Material and Methods:** feces samples were collected with the help of sterile swabs from 171 birds living in the city of São Paulo; cockatiels (n=67), budgerigars (n=59), and agapornis (n=45). The material was transported to the laboratory under refrigeration, then cultured and identified. Forty two *E. coli* colonies were isolated and in them it was performed the investigation of genes *eae*, *stx1*, and *stx2* through PCR. In the strains identified as STEC, the antimicrobial resistance profile was determined by the disc diffusion method and phylogenetic analysis, according to the new Clermont phylotyping method, which classifies the strains into groups: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D, E and F. **Results and Discussion:** The results classified 8/42 (19.4%) strains as STEC, positive for genes *eae* and *stx2*, with three being isolated from cockatiels (3/67) and five from budgerigars (5/59). The results revealed a 4.6% frequency of STEC (8/171), with a percentage of 8.47% in budgerigars (5/59), 4.47% in cockatiels (3/67), and 0% in agapornis (0/45). Most of the strains were classified as sensitive to the 18 tested antibiotics, belonging to eight different classes. Among the cockatiel isolates, only one Sulfamethoxazole-trimethoprim-resistant strain was observed. The

budgerigar isolates were resistant to Sulfamethazine (1/5) and Streptomycin (1/5). No multiresistance profile was observed. In the phylogenetic analysis, 2/8 were classified as non-typeable, 3/8 as B<sub>2</sub>, 2/8 as F, and 1/8 as Clade I. Strains having genotypic profile *stx2* + *eae* are usually associated with severe diseases of human, such as hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. : The STEC-positive results indicated that the maintenance of psittacidae in home environments could be a condition with zoonotic risk. **Keywords:** *Escherichia coli*, STEC, Psittacidae, Zoonosis. Support: CAPES.

### PROJETO: INFECÇÃO OU DOENÇA NOS ANFÍBIOS SOBREVIVENTES DA COSTA RICA: DIAGNOSTICANDO QUITRIDIOSIS NO NEOTRÓPICO

ALVARADO, GILBERT<sup>1,9</sup>; FORZÁN; MARÍA<sup>2,3</sup>; PUSCHENDORF, ROBERT<sup>4</sup>; ARAYA, JUAN JOSÉ<sup>5</sup>; PINTO, ADRIÁN<sup>6</sup>; GONZÁLEZ, SARA<sup>7</sup>; MORALES, JUAN ALBERTO<sup>8</sup>; CATÃO-DIAS, JOSE LUIZ<sup>9</sup>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.
2. Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island (UPEI), Canada Prince Edward Island, Canada.
3. Canadian Wildlife Health Cooperative, Atlantic Region, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island (UPEI), Canada Prince Edward Island, Canada.
4. School of Biological Sciences, Plymouth University, Plymouth, United Kingdom.
5. Centro de Investigaciones en Productos Naturales (UCR), San José, Costa Rica.
6. Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (UCR), San José, Costa Rica.
7. Laboratorio de Ensayos Biológicos (UCR), San José, Costa Rica.
8. Servicio de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
9. Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução:** Nas últimas décadas, os anfíbios tem apresentado um padrão de declínio populacional extremamente alarmante. Decorridos mais de 25 anos de estudos sobre os fatores responsáveis por este fenômeno, ainda há muitas dúvidas sobre a sua verdadeira causa. No final dos anos noventa foi aventada a hipótese de que o problema fosse ocasionado pela infecção pelo fungo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd); no entanto, até o presente, esta condição ainda não foi confirmada. A Costa Rica é um dos epicentros deste fenômeno onde muitas espécies nativas desapareceram e algumas foram declaradas extintas. Contudo, na atualidade, neste país, ainda há algumas populações remanescentes que permitem a análise das características que possibilitaram a sua sobrevivência. Ao longo dos últimos anos, a infecção pelo Bd tem sido exaustivamente investigada quanto à sua distribuição geográfica, taxonômica e temporal, mas pouco foi realizado para o esclarecimento da sua patogênese.

**Material e métodos:** O presente trabalho foi delineado para comparar as condições anatomo-patológicas, clínico-patológicas e metabólicas da doença e infecção em *Lithobates vibicarius* e *Lithobates taylori* experimentalmente infectados com Bd. Estas duas espécies foram selecionadas com base em seu tamanho corporal, relativa facilidade de captura e por apresentarem relações distintas de sobrevivência frente à quitridiomiose. Cada rã será colocada num recipiente de plástico individual (70X95X150 mm<sup>3</sup>) para seu transporte e subsequentemente serão mantidas em recipientes de plástico individuais (230X230X350 mm<sup>3</sup>) em amplitudes de temperatura (18-20 °C) e ciclos de luz (12 h luz / 12 h escuro) controlados e estabelecidos junto ao Laboratório de

Ensayos Biológicos (UCR) e segundo as normas internacionais de bem-estar animal e aprovadas pelas respectivas comissões de ética no uso de animais da FMVZ-USP e CICUA-UCR. Após período de adaptação ao cativeiro, os animais serão infectados experimentalmente e os dados colhidos serão avaliados em função dos achados anátomo-patológicos, clínicos-patológicos e metabólicos.

**Resultados esperados:** Estabelecimento de padrões normais para as três variáveis nas duas espécies e identificar as diferenças existentes entre as duas espécies: a que sofreu severo declínio (*Lithobates taylori*) e a que parece ter mantido populações estáveis ao longo do tempo (*Lithobates vibicarius*).

**Conclusões:** Serão avaliados aspectos dos mecanismos de defesa de uma espécie hospedeira frente à infecção por patógeno que é considerado como responsável pelo declínio populacional de anfíbios. **Apoio financeiro:** UCR, CAPES, APANAJUCA-CR. **Palavras-chave:** Anfíbios. Costa Rica. Quitridiomycosis. *Lithobates vibicarius*. *Lithobates taylori*.

### FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE POPULATIONS IN THREE NEOTROPICAL SNAKE SPECIES

CARVALHO, MARCELO PIRES NOGUEIRA<sup>1</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, NICOLLE GILDA TEIXEIRA<sup>1</sup>; GOMES, CRISTINA DE OLIVEIRA MASSOCO SALLES<sup>1</sup>; ROSSI, SILMARA<sup>2</sup>; SANT'ANNA, SÁVIO STEFANINI<sup>3</sup>; CATÃO-DIAS, JOSÉ LUIZ<sup>1</sup>; GREGO, KATHLEEN FERNANDES<sup>3</sup>.

1 Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP).

2 Luiz de Queiroz College of Agriculture and Center of Nuclear Energy in Agriculture University of São Paulo (USP).

3 Laboratory of Herpetology, Butantan Institute.

Inflammatory processes are known to protect vertebrates from injuries and infections. However, from an immunological perspective the role of granulocytic and mononuclear leukocytes in snakes' inflammatory process is poorly understood. In this context, leukocyte classification in these animals is not clearly defined, with authors disagreeing on existent cell types and their classification. Published data on reptilian leukocytes classification differentiates them into five cell groups: lymphocytes, azurophils, heterophils, basophils and monocytes. Nonetheless, the presence of eosinophils in the peripheral blood of snakes is occasionally described; their existence has not been proved in many species, except in *Ophiophagus hannah* and *Naja naja*. Azurophils are another leukocyte type in regard to classification. Some authors believe that these cells are merely immature monocytes, while others consider azurophils as cells with unique characteristics and roles, present only in reptiles with lesser numbers in lizards, chelonians and crocodylians, but greater numbers in snakes. Due to the great variation of snakes' leukocytes on cytochemistry, an analysis focused exclusively on optical morphology is insufficient to determine different cell types. Thus, additional studies and methods, as flow cytometry, are important to better understanding the function and origin of each cell type. The objective of this research was to adapt leukocyte density gradients for snake blood samples, and characterize recovered cells based on size, presence of granules and internal complexity by flow cytometry, enabling the qualitative and semi-quantitative assessment of cells constituting the immune system of *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus*. Blood samples were collected in tubes containing sodium heparin from 30 snakes (10 of each species: five male, five female). Thus, the fresh blood was centrifuged in the presence of either two commercial density gradients: Ficoll-Paque PLUS® and Percoll®. After centrifugation, leukocytes were recovered and analysed according to size and internal complexity by flow cytometry. Comparison between gradient methods for leukocyte isolation did not show any difference

(Kruskal-Wallis-Dunns,  $p > 0.05$ ). Flow cytograms did not evidence differences in the populations distribution between snakes of the same species, especially for mononuclear cells (Skewness and Kurtosis statistical test). When verified by means of flow cytometric cell sorting and confirmed by optical microscopy, populations were mainly composed of small lymphocytes, large lymphocytes, azurophils and heterophils. The investigation identified cell populations and established leukocyte cytograms for these snakes allowing functional and diagnostic assays through flow cytometry. **Keywords:** Cytometry. Neotropical snake. Leukocyte.

### LIPOPOLISSACARÍDEO INDUZ COMPORTAMENTO DOENTIO EM RATAS LACTANTES, DIMINUI A VOCALIZAÇÃO ULTRA-SÔNICA E EXACERBA A ATIVIDADE DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NOS FILHOTES MACHOS

NASCIMENTO, AMANDA<sup>1</sup>; ALVES, GLAUCIE<sup>1</sup>; MASSOCO, CRISTINA<sup>1</sup>; TEODOROV, ELIZABETH<sup>3</sup>; FELÍCIO, LUCIANO<sup>1</sup>; BERNARDI, MARIA MARTHA<sup>2</sup>.

1. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo

2. Programa de Pós-Graduação de Meio Ambiente e Patologia Experimental e Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, UNIP, São Paulo

3. Centro de Matemática, Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC, Santo André, Brasil

**Objetivo:** Foram analisados os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) sobre o comportamento materno durante a lactação e as suas possíveis correlações com alterações no emocional e na resposta imunológica na prole de ratas.

**Métodos:** Ratas lactantes receberam 100 ug / kg de LPS i.p. ou solução salina no terceiro dia de lactação (LD3). A atividade geral e o comportamento materno foram registrados no LD5, dia em que houve o pico de febre. Nos filhotes machos, os parâmetros hematológicos e as vocalizações ultra-sônicas (USVs) foram avaliados no LD5. No desmame, foi administrada uma dose adicional de LPS (50 ug /ug, ip) em filhotes machos nos quais foi efetuada a avaliação do comportamento em campo aberto e o burst e a fagocitose de leucócitos. **Resultados:** Foi observada a redução no tempo para recuperação do primeiro filhote contudo não houve qualquer efeito sobre comportamento agressivo e materno. No LD5, foi constatada a redução na frequência de USVs, mas não foram encontrados sinais de inflamação. Ao desmame, foi observado aumento na atividade do sistema imunológico porém sem a ocorrência de diferenças em campo aberto. **Conclusão:** Os resultados obtidos indicaram que a inflamação em mães lactantes pode alterar a interação mãe/filhote e pode ter produzido, a curto e longo prazo, efeitos sobre o comportamento dos filhotes, bem como nas vias biológicas que modulam as suas respostas inflamatórias quando desafiados com endotoxina bacteriana.

**Apoio financeiro:** CAPES. **Palavras-chave:** Lipopolissacarídeo. Comportamento animal. Ratos, fêmeas. Sistema imunológico.