

UNIVERSIDADE DO PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR/ RECURSOS MARINHOS

**O PAPEL DOS LARÍDEOS COMO PORTADORES E
DISSEMINADORES DE *SALMONELLA* SPP.**

Elsa Maria Leclerc Duarte

UNIVERSIDADE DO PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR/ RECURSOS MARINHOS

**O PAPEL DOS LARÍDEOS COMO PORTADORES E
DISSEMINADORES DE *SALMONELLA* SPP.**

Elsa Maria Leclerc Duarte

**Trabalho co-financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia
(BM 15292/ 98) e pela Faculdade de Medicina Veterinária, U.T.L.**

RESUMO

A população de Larídeos tem aumentado grandemente devido a uma extrema adaptabilidade destas aves a novos habitats e fontes de alimento. As espécies mais frequentemente encontradas na nossa costa são *Larus cachinnans*, a gaivota-de-pata-amarela e *Larus fuscus*, a gaivota-de-asa-escura. Existem vários estudos que revelaram prevalências elevadas nos Larídeos. O desenvolvimento deste trabalho teve por objectivos contribuir para a avaliação do papel destas aves como portadores de *Salmonella*, visto no nosso país, existir uma notória carência de dados epidemiológicos, nomeadamente frequência de infecção, componentes ambientais e vias de transmissão.

Num total de 306 amostras de fezes, 37 amostras foram positivas (12,1%). Os serotipos encontrados foram: *S. Typhimurium* (36,8%), *S. Derby* (18,4%); *S. Enteritidis* (10,5%); *S. Agona* e *S. Hadar* (7,9%); *S. Goettingen*, *S. Newport* e *S. Virchow* (5,3%); *S. Bardo*, *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Ohio*, *S. Orion* e *S. II 1,4,12,27:b:-* (2,6%). Os isolados com antibioresistências (68,7%), corresponderam a 24 perfis diferentes. Foram encontrados dois tipos fágicos diferentes de *S. Typhimurium* 5+: PT additional 10 (6 isolados) e PT 12 (5 isolados).

Os resultados demonstram que as gaivotas podem ser portadoras e disseminadoras de *Salmonella* spp., transportando germes entre áreas adjacentes devido à sua mobilidade. Os serotipos, fagotipos e perfis de antibioresistências encontrados, mostram que as estirpes isoladas não são próprias dos Larídeos. Torna-se possível, devido a natureza detritívora destas aves, adoptá-las como modelos indicadores de contaminação ambiental, denunciando eventuais deficiências no confinamento e/ou tratamento de resíduos sólidos e efluentes de uma determinada área geográfica.

PALAVRAS CHAVE: Larídeos, sanidade ambiental, *Salmonella*, serotipos, antibiogramas, fagotipos

ABSTRACT

Larids population has been highly increasing due to an extreme adaptability of these birds to new habitats and food resources. The most frequent species found along the Portuguese coast are *Larus cachinnans*, the Yellow-legged gull and *Larus fuscus*, the Lesser black-backed gull. Several studies have found larids to be some of the major carriers of *Salmonella*. The purpose of this study is to evaluate the role of these birds as carriers of *Salmonella*, as in Portugal there is a considerable lack of epidemiological data, namely infection frequency, environmental components and transmission routes.

In 306 faeces samples, 37 were found to be positive (12.1%). The serotypes found were: *S. Typhimurium* (36.8%), *S. Derby* (18.4%); *S. Enteritidis* (10.5%); *S. Agona* and *S. Hadar* (7.9%); *S. Goettingen*, *S. Newport* and *S. Virchow* (5.3%); *S. Bardo*, *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Ohio*, *S. Orion* and *S. II 1,4,12,27:b:-* (2.6%). The antibioresistant isolates (68.7%) matched with 24 different profiles. Two different phage types were found in 11 *S. Typhimurium* 5+ isolates: PT additional 10 (6 isolates) and PT 12 (5 isolates).

The results show that gulls can be carriers and spreaders of *Salmonella* spp. and their mobility enables them to carry out germs to other areas. Serotypes, phage types and antibioresistance profiles show that isolated strains are not specific to larids. Due to their scavenger nature, these birds can become indicators of environmental contamination, globally stressing out confinement or treatment deficiencies of solid residues and effluents of a determined geographical area.

KEY WORDS: Larids, environmental health, *Salmonella*, serotypes, antibiograms, phage types

AGRADECIMENTOS

Ao apresentar esta dissertação, cabe-nos agradecer as valiosas contribuições de todos os que, directa ou indirectamente, possibilitaram a execução deste trabalho, nomeadamente:

- Ao Prof. Doutor F. Bernardo, Professor Associado da F.M.V, por todo o incentivo expressado, desde da parte curricular até à aceitação da orientação deste projecto e pela disponibilidade pessoal e entusiasmo científico que nos contagiou, desde o auxílio na colheita de parte das amostras, até aos imprescindíveis ensinamentos, sugestões pessoais e bibliográficas que nos facultou, confessamos a nossa estima e mais sentida gratidão;

- Ao Prof. Doutor Martins Mendes, Director do Centro de Veterinária e Zootecnia, pelo acolhimento concedido e pela inteira disponibilização de grande parte dos recursos técnicos e bibliográficos utilizados, o nosso profundo reconhecimento;

- À Dra. Lurdes Morais, da Reserva Natural das Berlengas, por nos ter amavelmente recebido e facultado extensa bibliografia sobre gaivotas, bem como nos ter fornecido valiosas explicações práticas decorrentes da sua vastíssima experiência pessoal sobre a biologia e ecologia destas espécies, o nosso sincero agradecimento;

- Às colaborações imprescindíveis na determinação dos marcadores epidemiológicos da Dra. Marina Martins pelo transporte das estirpes ao L.N.I.V, da Dra. Rosário Rosinha (L.N.I.V.) pela serotipificação e do Dr. Jorge Machado (I.N.S.A.) pela fagotipificação de *Salmonella* Typhimurium, os nossos mais vivos agradecimentos;

- À Doutora Gabriela Veloso e à Dra. Constança Palma Féria o nosso reconhecimento pela bibliografia indispensável que nos concederam para a execução de parte do trabalho experimental;

- À Eng^a. Maria Elisa Duarte da A.R.S. de Lisboa, agradecemos ter-nos prontamente facultado explicações sobre a legislação em vigor para as águas balneares, bem com o panorama actual registado na Costa do Estoril;

- À Dra. Filomena Pereira, Eng^a Manuela Guerra, Eng^a Susana Pereira e à colega Dra. Luísa Mateus pela colaboração e camaradagem que constantemente manifestaram e que nos tocou, a nossa gratidão com sentida amizade;

- À técnica superior de diagnóstico e terapêutica Anabela Lança, do Laboratório de Inspeção Sanitária, à D^a Alda Francisco e D^a Filomena Sobrinho (C.V.Z) e ainda à D^a Glória Barros pela pronta e eficaz colaboração na disponibilização de todo o material, os nossos maiores agradecimentos;

- Por fim, à Esmeralda e ao João, que madrugaram em inúmeras ocasiões para nos oferecer colaboração na amostragem, o nosso reconhecimento pela amizade demonstrada.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I- ASPECTOS DA BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS LARÍDEOS.....	4
1.1. A família <i>Laridae</i>	4
1.2. Espécies existentes em Portugal.....	5
1.3. Evolução da população.....	12
1.3.1. Evolução espacial: habitat e mobilidade.....	12
1.3.2. Evolução demográfica.....	15
1.3.2.1. Crescimento da população.....	15
1.3.2.2. Medidas de controlo da população.....	17
1.4. Comportamento alimentar dos Larídeos.....	19
1.5. O impacto das aves silvestres sobre a sanidade.....	22
CAPÍTULO II- BIOLOGIA E ECOLOGIA DO GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	27
2.1. Definição.....	27
2.2. Características bioquímicas.....	27
2.3. Taxonomia.....	28
2.4. Estrutura antigénica.....	30
2.4.1. Antigénios somáticos.....	30
2.4.2. Antigénios capsulares.....	31
2.4.3. Antigénios flagelares.....	32
2.5. Nomenclatura.....	33
2.6. Ecologia de <i>Salmonella</i> spp.	34
2.6.1. Factores físico-químicos gerais.....	34
2.6.2. Sobrevivência em resíduos sólidos e efluentes.....	35
2.6.3. Sobrevivência na água do mar.....	36
CAPÍTULO III- PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> EM POPULAÇÕES DE LARÍDEOS.....	38
3.1. Objectivos.....	38
3.2. Materiais e métodos.....	38
3.2.1. Amostragem.....	38
3.2.2. Pesquisa e identificação de <i>Salmonella</i>	43
3.2.2.1. Pré-enriquecimento.....	43
3.2.2.2. Enriquecimento.....	43
3.2.2.3. Isolamento.....	44
3.2.2.4. Identificação.....	46
3.3. Resultados.....	47
3.3.1. Prevalência de <i>Salmonella</i> spp.	47
3.3.2. Eficácia do protocolo de isolamento.....	50
3.4. Discussão.....	52
3.4.1. Discussão das prevalências em <i>Salmonella</i> spp.- Considerações epidemiológicas.....	52
3.4.1.1. Riscos para a Saúde Pública.....	58
3.4.1.1.1. Correlacionamento com prevalências em humanos e em animais.....	58
3.4.1.1.2. Correlacionamento com a degradação da qualidade das águas.....	59
3.4.1.2. Estado de portador assintomático.....	61
3.4.1.3. Transporte, propagação e disseminação de salmonelas.....	65
3.4.1.4. Carga bacteriana e tempo de excreção.....	67
3.4.1.5. Prevalências segundo a espécie.....	69

3.4.1.6.Prevalência segundo a idade, o sexo e a época de reprodução.....	71
3.4.1.7.Correlação com a localização das amostragens e proximidade de fontes alimentares contaminadas.....	73
3.4.1.7.1.Estudos anteriores.....	73
3.4.1.7.2.Prevalências por praia-Comparação com a qualidade das águas.....	75
3.4.2.Discussão do protocolo de pesquisa de <i>Salmonella</i>	77
3.4.2.1.Amostragem.....	78
3.4.2.2.Pré-enriquecimento.....	79
3.4.2.3.Enriquecimento selectivo.....	82
3.4.2.4.Geloses de isolamento.....	86
3.4.3. Reproducibilidade dos resultados.....	89
CAPÍTULO IV-ESTUDO DE MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS.....	91
4.1.Objectivos.....	91
4.2.Material e métodos.....	92
4.2.1.Serotipificação.....	92
4.2.2.Fagotipificação.....	92
4.2.3.Antibiogramas.....	92
4.3.Resultados.....	94
4.3.1.Serotipos.....	94
4.3.2.Antibiogramas e fagotipos.....	97
4.4.Discussão.....	98
4.4.1.Serotipos.....	98
4.4.2.Antibioresistências e fagotipos.....	102
CONCLUSÕES GERAIS.....	104
BIBLIOGRAFIA.....	106
ANEXO.....	116

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.2.1.-Área geográfica de distribuição das principais espécies de Larídeos avistadas no nosso país.....	8
Figura 1.2.2.-Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (I)	9
Figura 1.2.2.-Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (II)	10
Figura 1.2.2.-Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (III)	11

CAPÍTULO II

Quadro 2.3.1.-Perfis bioquímicos discriminativos das subespécies de <i>Salmonella</i>	29
---	----

CAPÍTULO III

Figura 3.2.1.1.- Distribuição das frequências das amostras pelos cinco pontos de colheita.....	40
Quadro 3.2.1.1.-Data de colheita dos 18 lotes, localização e nº de amostras por lote.....	42
Figura 3.2.2.1.-Esquema do protocolo de análise para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	45
Quadro 3.3.1.1.-Frequência de isolamentos de <i>Salmonella</i> spp. em fezes, areia e água.....	47
Quadro 3.3.1.2.-Prevalência de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de fezes por lote.....	48
Gráfico 3.3.1.1.-Amostras positivas em relação ao número total de amostras por praia.....	49
Quadro 3.3.1.3.-Frequência de amostras positivas em relação ao número total de amostras por praia.....	50
Quadro 3.3.2.1.-Eficácia dos caldos de enriquecimento no isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	51
Quadro 3.3.2.2.-Eficácia das geloses selectivas no isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	51
Quadro 3.4.1.1.-Papel dos Larídeos como portadores de <i>Salmonella</i> spp.-Estudos anteriores (I)	53
Quadro 3.4.1.1.-Papel dos Larídeos como portadores de <i>Salmonella</i> spp.-Estudos anteriores (II)	54
Quadro 3.4.1.1.-Papel dos Larídeos como portadores de <i>Salmonella</i> spp.-Estudos anteriores (III)	55
Quadro 3.4.1.1.-Papel dos Larídeos como portadores de <i>Salmonella</i> spp.-Estudos anteriores (IV)	56
Quadro 3.4.1.1.-Papel dos Larídeos como portadores de <i>Salmonella</i> spp.-Estudos anteriores (V)	57

CAPÍTULO IV

Quadro 4.3.1.1.-Distribuição dos serotipos em fezes.....	95
Gráfico 4.3.1.1.-Frequência dos serotipos em fezes.....	95
Gráfico 4.3.1.2.-Variabilidade dos serotipos por lote.....	96
Quadro 4.3.2.1.-Perfis de antibioresistências dos isolados e respectiva frequência por ordem decrescente.....	97

1.1. Introdução

A Salmonelose constitui um sério problema de higiene-sanitário à escala mundial, com graves repercussões para a saúde humana, devido às explorações pecuárias e com preocupantes incidências em seres humanos (Wood, 1989), estima-se que 3 em cada 100 humanos são afetados anualmente por esta doença (Castro, 1991). Em Portugal a incidência calculada da Salmonelose é superior a 100 casos/1000 habitantes (Bernardo, 1991).

A Salmonelose é causada por bactérias pertencentes por um número enorme de serovariedades de *Salmonella* spp., sendo as mais comuns e mais ubiquitárias: *Salmonella* Typhimurium, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* (Wood, 1989).

A prevalência das diferentes serovariedades de Salmoneloses são variáveis em função das condições ambientais, do nível de desenvolvimento tecnológico e económico das práticas agrícolas, da qualidade e quantidade de transformação de alimentos, dos hábitos de manipulação alimentar, da susceptibilidade da espécie e do indivíduo (Wood, 1989). Existem, portanto, diferentes biovariedades de *Salmonella*.

Os principais reservatórios de *Salmonella* spp. são muito variados, mas salientam-se essencialmente os animais, os humanos, os insetos, portadores comuns ao nível do respectivo hospedeiro.

Embora a maioria dos casos de Salmonelose humana, várias espécies têm sido incriminadas na etiologia de alguns casos recorrentes de infecção intestinal, particularmente os associados à ingestão de alimentos crus, com destaque para as ostras e lambujinhas. Estes alimentos são a principal via de contaminação das águas por microrganismos patogénicos, nomeadamente as salmonelas, assumindo uma relevância importante para a saúde humana, quando utilizados no consumo humano. Em relação aos ambientes aquáticos, nomeadamente ao sistema marinho/ estuarino, o seu papel na transmissão de Salmonelose humana é mal avaliado, havendo indícios da existência de reservatórios naturais de Salmonelose, nomeadamente répteis, peixes e bivalves, associados a casos de Salmonelose em Cetáceos (Minette, 1986).

Embora se reconheça o papel de várias espécies de aves como reservatórios naturais de Salmonelose em várias espécies silvestres (Faddoul *et al.*, 1966; Wood, 1989; Hubálek *et al.*, 1995) e Rosef, 1983; Hubálek *et al.*, 1995). A importância da transmissão de Salmonelose nestas aves é relativamente baixa,

encontrando-se por vezes serotipos exóticos, raramente associados a surtos de salmoneloses humanas. No entanto, um grupo de aves pertencentes ao género *Larus* consegue não somente apresentar-se como portadores regulares de *Salmonella* spp. (Fricker, 1984), como apresentar prevalências muito elevadas como 55% no caso de um estudo realizado por Fenlon (1981).

As prevalências de agentes zoonóticos nestas aves assumem uma grande importância devido a uma inevitável complexidade nas componentes epidemiológicas: Em primeiro lugar, têm a possibilidade de albergarem as mesmas salmonelas que os outros animais de sangue quente e, em segundo lugar, representam os animais portadores com maior mobilidade, nomeadamente nos meses de Outono e Primavera, em que, para algumas espécies, milhares de indivíduos se deslocam entre áreas geográficas. Também quando os Larídeos se encontram nas proximidades de grandes centros urbanos, um possível impacto sobre a sanidade ambiental urbana tem que ser ponderado. À luz de todos os novos dados sobre a biologia e ecologia, estas espécies sobrepõem e alternam entre ambiente marinho e ambiente urbano, cobrindo vastas áreas.

Alguns autores correlacionaram a frequência de agentes patogénicos nos Larídeos e o número de casos humanos de infecção ou de animais de interesse pecuário (Williams *et al.*, 1976 e 1977; Johnston *et al.*, 1979, Benton, 1983; Coulson *et al.*, 1983; Monaghan *et al.*, 1985; Fricker, 1984; Kapperud e Rosef, 1983; Hubálek *et al.*, 1995; Palmgren *et al.*, 1997). No entanto, o número de trabalhos publicados é escasso ou mesmo inexistente, como é o caso do nosso país. Com efeito, desconhece-se totalmente qual a frequência com que se encontram gaivotas portadoras e, por isso, também não se sabe qual a relevância em termos sanitários deste tipo de infecção nestas aves.

Concluí-se assim que, existe uma elevada carência de dados epidemiológicos neste domínio e no nosso país, não somente no estabelecimento de prevalências, mas também nas componentes ambientais das vias de transmissão de salmoneloses. A significância prática das infecções salmonélicas, quer em medicina veterinária, quer em higiene alimentar, torna imperativo a avaliação do papel destas aves como portadoras e agentes dispersores visto estas partilharem, cada vez em maior número, o ecossistema marinho com o Homem e por isso justificando, em pleno, o desenvolvimento do presente estudo.

Por outro lado, a degradação das condições sanitárias do meio ambiente, da qualidade das águas e a acessibilidade a fontes de alimentação menos convencionais (ETAR, lixeiras), pode contribuir para debilitar os estado de saúde das gaivotas e, eventualmente, condicionar o aumento das taxas de infecção.

CAPÍTULO I- ASPECTOS DA BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS LARÍDEOS

A descrição exaustiva da biologia e ecologia dos Larídeos no âmbito de uma dissertação de mestrado é quase impraticável. Por isso, nesta breve nota introdutória, serão apenas focados alguns aspectos relevantes para o enquadramento do tema, nomeadamente aqueles susceptíveis de predispor a uma maior contaminação destas aves por bactérias enteropatogénicas conforme o âmbito do estudo experimental efectuado. Estes factores precipitantes são: Uma crescente aproximação dos habitats destas espécies com os das populações humanas; a evolução demográfica em termos mundiais e locais, e os aspectos inerentes à modificação da ecologia alimentar.

1.1. A família *Laridae*

As gaiivotas (*Larus* spp.) são geralmente aves robustas, de pés lobados, com asas compridas e estreitas, bico forte e cauda curta, sendo por vezes difícil diferenciar os sexos. Os juvenis e imaturos evidenciam-se pela plumagem sarapintada de tons castanhos. Esta plumagem reveste-se de tons progressivamente mais pálidos após cada muda anual. A plumagem definitiva de adulto ocorre após 4 a 5 anos nas espécies de maior porte e 1 a 2 anos nas espécies de menor porte (Cramp e Simmons, 1983). As fêmeas têm geralmente uma corpulência inferior às dos machos.

Na época reprodutiva que tem lugar, como para a maioria das aves, na Primavera, cada fêmea põe cerca de três ovos. O papel de guardião do ninho pode ser desempenhado por ambos os sexos, embora seja o macho o mais habitual.

Normalmente, denominam-se juvenis as aves com idades inferiores a 40 dias, imaturos as aves sem plumagem definitiva (idade inferior a 4 anos para *Larus cachinnans*) e adultos as aves já com a plumagem característica.

Durante o ano ocorrem duas mudas de plumagem, sendo a muda pós-reprodução completa e a pré-reprodução confinada às zonas cervicais e cefálicas (excepto algumas espécies). A ave mais velha anilhada, até agora identificada, pertencia à espécie *L. argentatus* e contava com 31 anos e 11 meses (Rydzewski, 1978 citado por Cramp e Simmons, 1983). A esperança média de vida de *L. argentatus* oscilla entre 15 a 20 anos (Morais, comunic.pessoal, 1999).

Em linguagem comum, estas aves são denominadas, “gaivota” (a maior parte dos Larídeos), e “alcatraz” no caso de *Larus marinus* ou ainda “guincho” no caso de *Larus ridibundus*.

Globalmente, estão descritas cerca de 45 espécies de gaivotas (Cramp e Simmons, 1983), todas pertencentes a família *Laridae*, Ordem dos Charadriformes.

Embora o assunto tenha sido controverso e já tenham sido reconhecidos entre 7 e 12 géneros nesta família ao longo deste século, a maior parte dos autores consideram existir apenas 5 géneros representativos (Cramp e Simmons, 1983): O género *Larus*, do qual existem cerca de 40 espécies, e os géneros *Rhodostethia* (1 espécie), *Rissa* (2 espécies), *Creagrus* (1 espécie) e *Pagophila* (1 espécie). Estes géneros inserem-se na sua totalidade na tribo *Larini* da sub-família *Larinae*, inserida por seu turno na família *Laridae* (Monroe Jr. *et al.*, 1993).

1.2. Espécies existentes em Portugal

De todas as aves aquáticas, as gaivotas são, certamente, das mais abundantes ao longo da costa continental.

Na Península Ibérica, foram observadas numerosas espécies do género *Larus*, bem como uma das espécies do género *Rissa* (*Rissa tridactyla*) (Bermejo *et al.*, 1986).

No estudo e na observação dos Larídeos no nosso país, bem como para tecer quaisquer considerações acerca da transmissão de agentes patogénicos por parte destas aves, torna-se importante diferenciar três tipos de espécies relativamente à mobilidade: As espécies residentes, as espécies invernantes, e as espécies que podem ser avistadas esporadicamente devido a fenómenos migratórios.

As espécies residentes no nosso país movem-se, na época não reprodutiva, entre diferentes zonas de alimentação ao longo da costa, seguindo por vezes os barcos de pesca. No mês de Abril, regressam à colónia para a reprodução.

As espécies invernantes apresentam maior mobilidade, passando no nosso país os meses mais rigorosos, regressando às colónias reprodutivas na Primavera. As principais colónias de reprodução estão situadas no Norte da Europa.

Entre as espécies residentes, *L. cachinnans*, a gaivota-de-pata-amarela é a mais importante. Hoje em dia, é considerada pela maioria dos zoologistas uma espécie à parte (Morais, comun.pessoal,1999). No entanto, a sua semelhança com *Larus argentatus* é grande, e muitos autores continuam a considerá-la como uma subespécie da gaivota argêntea. Por este motivo, são encontradas várias denominações na literatura, desde *L. argentatus lusitanicus* (Joiris,1978), ou ainda *Larus argentatus cachinnans* (Bermejo *et al.*,1986), diferenciado-se dos restantes espécimens de gaivotas argênteas por apresentarem as patas amarelas e não rosa-acinzentadas. Também a classificação de Cramp e Simmons (1983), continua a considerar três grupos dentro da espécie *Larus argentatus* Pontoppidan 1763: o grupo *argentatus*, o grupo *cachinnans* e o grupo *armenicus*, contabilizando um total de 7 raças diferentes na totalidade destes grupos, cada uma delimitada geograficamente. Ainda segundo estes autores, dentro do grupo *cachinnans* estariam diferenciadas três raças diferentes: *argenteus*, *atlantis* e *michaelis*. *Larus cachinnans* representaria a espécie que era denominada anteriormente por estes autores *Larus argentatus michaelis* (Morais, comunic.pessoal, 1999).

No nosso país, a colónia principal de reprodutores da espécie *Larus cachinnans* está situada na reserva natural das Berlengas, registando-se em seguida a ilha do Pessegueiro, na Costa Alentejana como a segunda colónia de maior importância (Morais, comunic.pessoal, 1999).

Outra espécie de gaivota importante no nosso país é *Larus fuscus*, a gaivota-de-asa-escura, maioritariamente invernante, embora haja uma proporção que se reproduz entre nós, nas Berlengas; O seu número é, no entanto, muito inferior aos exemplares de *L. cachinnans* (Morais *et al.*, 1998). Nestas ilhas, a proporção aproximada de *L. fuscus* / *L. cachinnans* estima-se de 1 para 1000 (Morais, comunic.pessoal, 1999).

Estas duas espécies podem acasalar entre si, dando origem a híbridos. Estes exemplares cruzados dão origem a confusões em termos de identificação *in situ* (Cramp e Simmons, 1983). Não se sabe se estes híbridos, também presentes nas Berlengas, têm capacidade para se reproduzir (Morais, comunic.pessoal, 1999).

Existem ainda dificuldades em distinguir os juvenis destas duas espécies, não estando presentes todas as características fenotípicas, nomeadamente as relativas à

plumagem e, desta forma, impossibilitando censos exactos de uma e outra espécie (Bermejo *et al.*, 1986).

Larus fuscus revela maior capacidade para se afastar das zonas costeiras relativamente às outras gaivotas de grande porte (Monaghan, 1983), permanecendo no entanto, perto de pontos de água importantes como rios de caudal elevado. A zona com maior número de indivíduos desta espécie no nosso país é constituída pelo estuário do Tejo (cerca de 26370 aves, registado por Teixeira em 1981), sendo também frequentemente observada nas margens do rio Guadiana (Bermejo *et al.*, 1986).

Larus ridibundus representa a espécie invernante mais numerosa no nosso país (Bermejo *et al.*, 1986), sendo a única espécie de Larídeo que se pode considerar comum e distribuída por todo o interior peninsular. No entanto, não se reproduz em Portugal (Isenmann, 1977), nidificando em países do centro da Europa (Cf. figura 1.2.1.). Com efeito, as zonas interiores da Península Ibérica, onde o clima é mais rude e seco, não são propícias à reprodução das espécies maiores, existindo zonas de altitude, onde apenas *L. ridibundus* mostra capacidade de se adaptar.

As espécies mais frequentemente avistadas no nosso país e a sua respectiva delimitação geográfica estão representadas na figura 1.2.1.- Cada mapa de distribuição mostra as áreas de invernada das espécies em azul, as áreas de reprodução a vermelho e a roxo os locais onde a ave ocorre todo o ano. As zonas de migração estão representadas a amarelo quando se encontram bem estabelecidas.

As características fenotípicas diferenciadoras de algumas espécies, sobretudo no que diz respeito à plumagem de adulto encontram-se no conjunto de figuras 1.2.2.

FIGURA 1.2.1.- Área geográfica de distribuição das principais espécies de Larídeos avistadas no nosso país (adaptado de Bruun *et al.*, 1995)

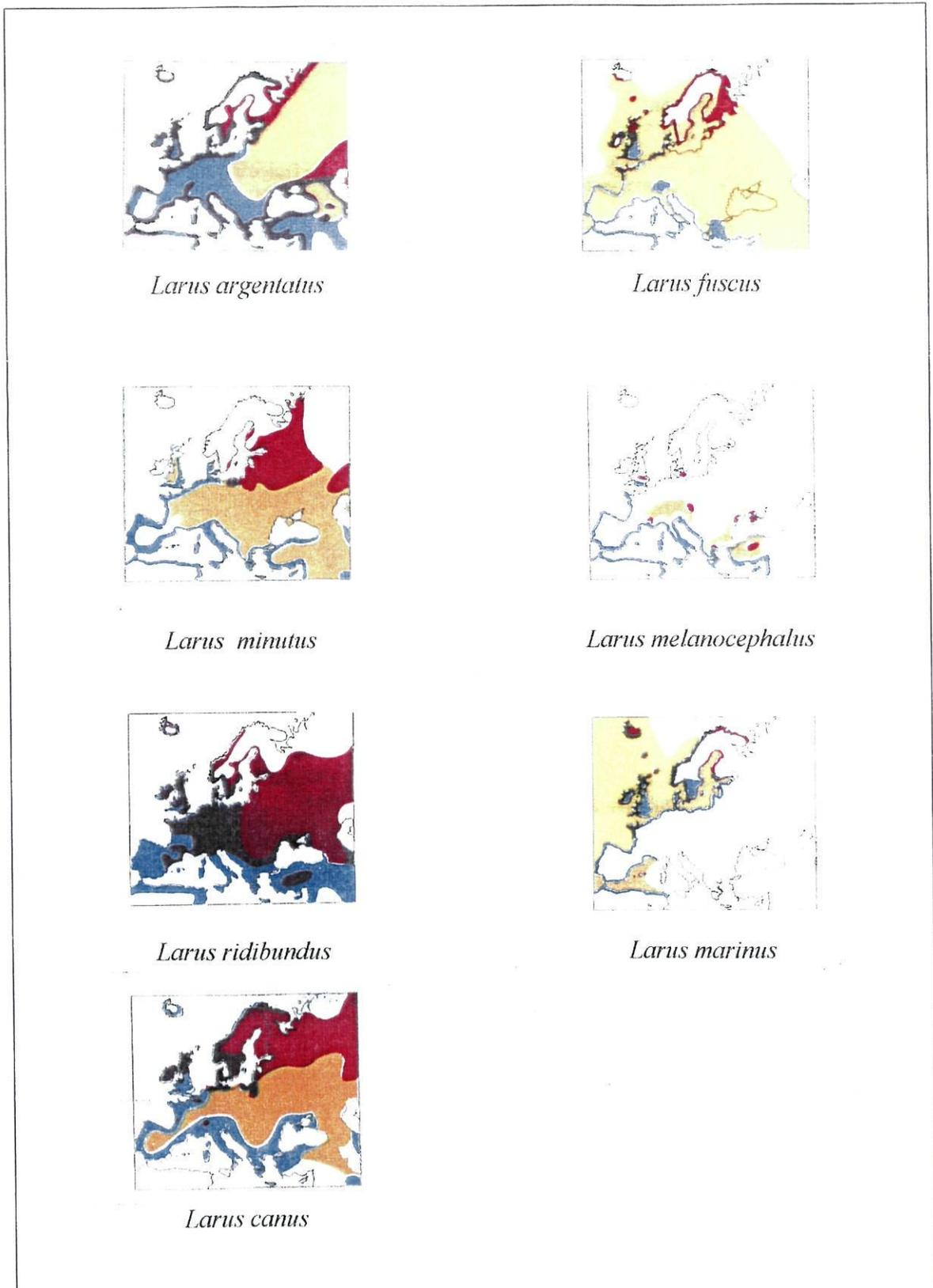
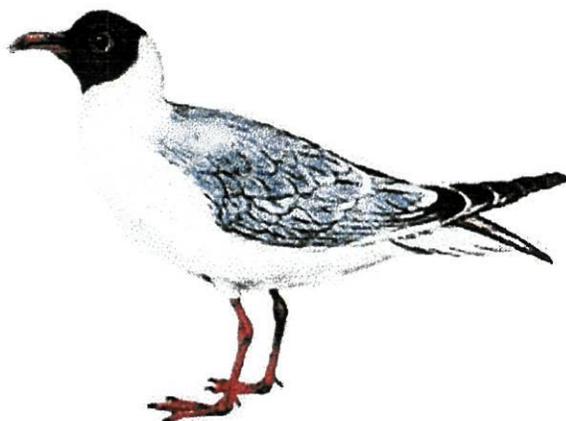


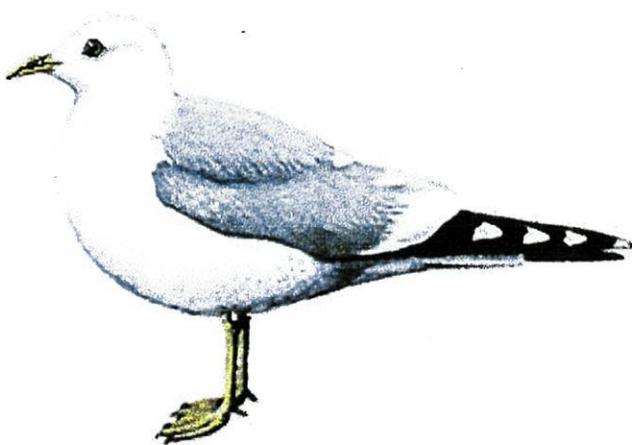
FIGURA 1.2.2.- Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (I)



Larus ridibundus

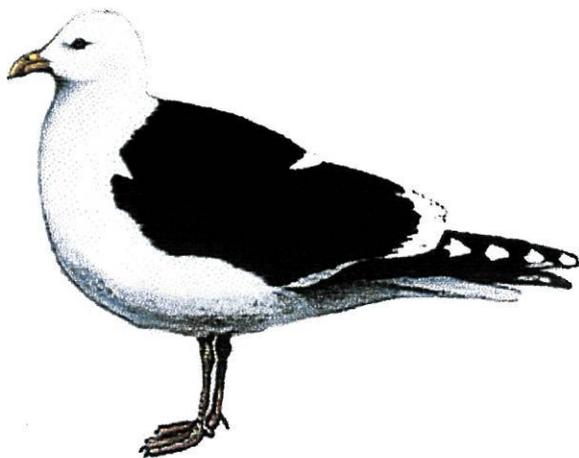


Larus melanocephalus



Larus canus

FIGURA 1.2.2.- Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (II)



Larus marinus



Larus audouinii

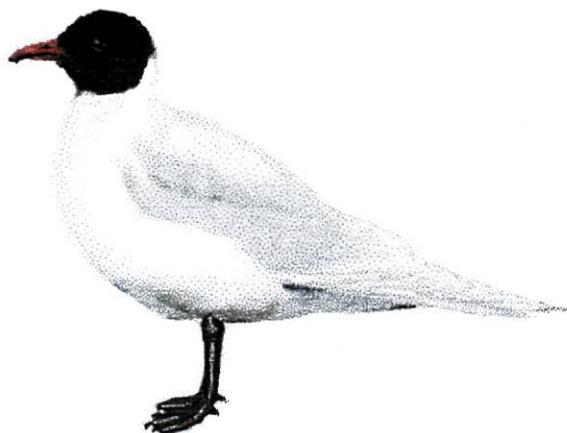
FIGURA 1.2.2- Principais características fenotípicas de algumas espécies de Larídeos (III)



Larus argentatus



Larus marinus



Larus fuscus

1.3. Evolução da população

Desde o princípio do século, são inúmeras as referências bibliográficas que referem grandes modificações na dinâmica habitual de diversas populações de gaivotas. Estas modificações resultam de um conjunto complexo de factores, muitos dos quais não estão provavelmente definidos, destacando-se, quase de forma unânime, a proliferação de novas fontes de alimento e o aparecimento de leis que protegem as aves, como principais explicações para as alterações verificadas. Desta forma, o acréscimo da população da grande maioria das espécies, as mudanças nos padrões de distribuição e nos habitats e os problemas de conflictualidade com o Homem e com o ambiente daí decorrentes, embora aqui tratados separadamente, encontram-se estreitamente correlacionados e por vezes mesmo, indissociáveis.

1.3.1. Evolução espacial: habitat e mobilidade

Os Larídeos, nomeadamente as espécies de maior porte, são aves marinhas que preferem as zonas costeiras, sobretudo na época reprodutiva, em que falésias rochosas e grandes declives proporcionam os locais mais adequados ao estabelecimento de colónias. Só na ausência destes acidentes geográficos poderá observar-se nidificação em zonas mais planas ou no caso de espécies mais disseminadas, como *L. ridibundus*. Geralmente, não são avistadas em florestas ou em zonas cuja vegetação seja demasiado densa, estando quase sempre incluído no habitat um elemento aquático (mar, lagos ou rios) (Cramp e Simmons, 1983). Certas espécies possuem maiores restrições em termos de colonização de novos habitats, nomeadamente *Larus cachinnans*, que permanece nas zonas costeiras, raramente aventurando-se em áreas muito interiores.

Ultimamente, a colonização de novos habitats tem sido cada vez mais importante devido a uma imensa adaptabilidade e versatilidade destas aves, concretizada através de uma falta de especialização extrema ao ambiente marinho, um oportunismo e uma variabilidade da dieta alimentar. Ao contrário da maioria das outras espécies de aves marinhas, as gaivotas beneficiaram da sua associação com a população humana (Furness e Monaghan, 1987), explorando novos recursos fornecidos pelo Homem. Têm-se observado

colônias estabelecidas em edifícios, localizados em zonas costeiras ou não, em telhados de casas, hangares de aviões, igrejas, pontes, entre outros. O hábito de nidificar em edifícios abandonados era raramente observado antes de 1940, aumentando consideravelmente após esta data (Cramp, 1971 citado por Monaghan, 1983). Monaghan (1983) refere existirem cidades em que a dimensão das populações destas aves é já muito problemática. Para o ornitólogo Inglês, Roch (1997, citado por Garcia), as cidades podem ser facilmente confundidas com ilhas por terem pequenas elevações por todo o lado, proporcionando abrigo, nomeadamente na época reprodutiva.

A procura de novos habitats, como os ambientes urbanos, tem sido atribuída à crescente pressão nos locais tradicionais devido ao crescimento das populações de aves (Monaghan e Coulson, 1977).

Relativamente à mobilidade, os Larídeos são capazes de se deslocarem a grandes distâncias, sobretudo entre colônias reprodutivas e área invernante, embora as deslocações diárias sejam de menor amplitude. As migrações propriamente ditas, entre áreas muito distantes só sucedem nas populações do Norte da Europa (Cramp e Simmons, 1983). É frequente confundirem-se os vastos períodos de tempo em que estas aves são observadas em repouso, com um sedentarismo que não corresponde à realidade.

A dispersão no Inverno é maior conforme a permanência ou não na zona de reprodução. Em qualquer dos casos e em qualquer espécie, a mobilidade máxima é invernante, onde as deslocações são feitas entre áreas afastadas, visto não existir exigência na procura de zonas mais resguardadas, propícias à constituição do ninho, nem a preocupação da guarda deste último.

Na época reprodutiva, os movimentos são constituídos maioritariamente por vaivém entre colónia e fonte alimentar mais próxima, de forma a abandonar a guarda do ninho o mínimo de tempo possível (Monaghan, 1979).

A fidelidade à colónia reprodutora, de ano para ano, é uma constante, condicionando a dispersão invernante à volta desta ou podendo mesmo ser utilizada fora da época reprodutora, para pernoitar (Sol *et al.*, 1995).

Já foram observados, no nosso país, imaturos de *L. cachinnans* que mudaram de

colónia, provavelmente de forma errática (Morais *et al.*, 1998). Quando a fidelidade à colónia não se verifica, existe uma maior predisposição das fêmeas relativamente aos machos para colonizarem fora da colónia natal (Monaghan, 1979).

Em qualquer das épocas, a amplitude das deslocações é sempre maior nos juvenis (Cramp e Simmons, 1983; Sol *et al.*, 1995; Morais e Vicente, 1995) e nos machos, visto estes revelarem maior tendência a seguir os barcos de pesca (Monaghan *et al.*, 1985; Morais, comunic.pessoal, 1999). No entanto, a capacidade de seguir barcos parece ser menor para *L. cachinnans* relativamente a outras espécies (Sol *et al.*, 1995).

Uma das causas apontadas para a maior dispersão dos juvenis, parece residir na competição pelo alimento entre estes e as aves adultas, obrigando-os a deslocarem-se para áreas mais distantes (Sol *et al.*, 1995).

No caso de *Larus cachinnans*, que constitui a espécie observada no nosso país com menor dispersão invernal, visto quase todos os indivíduos se reproduzirem na reserva da Berlenga, foi registada uma tendência para a expansão a Norte, já sendo avistada em França e nas ilhas Britânicas (Morais *et al.*, 1998).

Larus fuscus, que nidifica maioritariamente no Norte da Europa, sobretudo na Grã-Bretanha, migra parcialmente para Sul, podendo atingir o Norte de África. Para Roch (1997, citado por Garcia), o número de indivíduos desta espécie, residentes na área de Bristol, que migram para o Sul da Europa no Inverno, tem diminuído. Há cerca de 20 anos atrás, a população que permanecia durante o Inverno nesta cidade correspondia a 5% do total, hoje em dia este número ascende a 15%. Para este autor, uma das causas da diminuição da migração para o Sul, incluindo para Portugal, por parte desta espécie, poderá estar relacionada com os Invernos cada vez menos rigorosos naquele país, consequência directa de alterações climáticas globais.

Para Monaghan (1983), as várias referências à presença de colónias destas aves fora das áreas convencionais, deve-se mais ao crescimento da população, do que uma alteração do padrão comportamental, visto existir uma maior tendência para a expansão espacial do que para o aumento da densidade de ninhos por área. Também Morais *et al.* (1998) registaram, nas Berlengas, a colonização de áreas onde não existia nidificação quando a população cresceu em vez do aumento da densidade de ninhos.

1.3.2. Evolução demográfica

1.3.2.1. Crescimento da população

Em todo o mundo, o crescimento da população de Larídeos tem sido significativo ao longo do último século, com maior evidência nas espécies *Larus argentatus* e *L. fuscus* (Cramp e Simmons, 1983; Furness e Monaghan, 1987).

Nas ilhas Britânicas, o crescimento da população de *Larus argentatus* tem sido de cerca de 12,8% anualmente desde 1930, havendo uma duplicação da população cada seis anos (Chabrzyk e Coulson, 1976). Monaghan e Coulson (1977) referem números superiores para a mesma área entre 1969 e 1976, registando 17% de aumento anual para *L. argentatus* e 28% para *L. fuscus*, com uma taxa de formação de colónias urbanas de 9,3% por ano para estas duas espécies. Roch (1997, citado por Garcia) também refere que em 1972 foi avistado o primeiro casal de *Larus fuscus* a nidificar na cidade de Bristol, Grã-Bretanha, passando de uma centena de ninhos em 1980 para cerca de 950 em 1997.

Também no continente americano, a população de *L. delawarensis* tem aumentado. No Quebeque, Canadá, o número de pares aumentou de 1400 em 1977 para 21714 em 1991 (Lévesque *et al.*, 1993).

Na Península Ibérica, tem sido registado um crescimento acentuado nas populações de *L. cachinnans* e de *L. ridibundus* invernantes. Esta última espécie tem sido frequentemente avistada perto de grandes centros urbanos, atingindo já em Dezembro de 1978, mais de 38 000 indivíduos na área de Madrid e arredores. (Dominguez e Juana, 1984).

O crescimento da população de *L. cachinnans* também tem sido registado por toda a Península Ibérica, nomeadamente nas duas últimas décadas (Vicente, 1987; Sol *et al.*, 1995; Bárcena *et al.*, 1984 e 1987 citado por Morais *et al.*, 1998; Morais *et al.*, 1998).

No caso particular da reserva natural das Berlengas, alguns valores não são coincidentes. Cramp e Simmons (1983) referem 300 pares em 1939, enquanto que Lockley (1952 citado por Morais *et al.*, 1998) já refere a existência, no mesmo ano, de cerca de 1000 casais. Julga-se que a população permaneceu estável até 1974 (Vicente, 1987). A partir da década de 1981, em que as ilhas das Berlengas foram constituídas reserva natural, o crescimento da população de *L. cachinnans* tem sido exponencial. Teixeira (1983, citado por Morais *et al.*, 1998) registou 3000 casais em 1981 nas

Berlengas e 4800 casais em 1983. Entre 1981 e 1985, Morais *et al.* (1998) referem que o aumento foi cerca de 41%.

Vários motivos são apontados para um aumento tão pronunciado, destacando-se segundo Cramp e Simmons (1983):

- O aparecimento de leis que protegem as espécies, nomeadamente a proibição do abate de adultos e da apanha de ovos;
- O aumento do papel detritívoro, sobretudo em meios urbanos.

A protecção das espécies causou descidas bruscas nas taxas de mortalidade destas aves. Com efeito, no século passado, na Grã-Bretanha, um elevado número de gaivotas eram abatidas de forma desportiva até a proclamação de uma acta de preservação das aves marinhas em 1869 (Monaghan, 1983).

Em relação à *L. cachinnans*, pensa-se que o crescimento acelerado da população tenha sido maior a partir dos anos 70 devido à proliferação das fontes alimentares, permitindo a sobrevivência de adultos reprodutores nos meses de Inverno, quando as fontes tradicionais escasseiam (Vicente, 1987).

É reconhecida uma correlação entre a disponibilidade do alimento no Inverno e o crescimento da população, embora não esteja perfeitamente elucidado se existem outros factores, como a diminuição da predação, por outros animais, e a diminuição da incidência de patologias nestas aves (Monaghan, 1992).

No caso da reserva natural das Berlengas, Morais *et al.* (1998) referem que a diminuição da apanha de ovos e a obrigação de acampamento dos turistas nas áreas obrigatórias, resultou na diminuição da perturbação destas aves, favorecendo o sucesso reprodutivo.

Alguns trabalhos mostraram que a população de Larídeos diminuiu em algumas áreas geográficas (Pons, 1992). Uma das possíveis explicações sugere que, o aumento da densidade populacional, aliada à diminuição do alimento disponível, favorece grandemente fenómenos de competição pelo alimento, havendo um acréscimo dos comportamentos de predação de ovos e de canibalismo (Parsons 1971, citado por Monaghan 1979; Bukacinska *et al.*, 1996).

1.3.2.2. Medidas de controlo da população

Embora tenha sido reconhecida uma utilidade das gaivotas para o Homem no passado, usando-as para a localização de cardumes pelos pescadores (Martin, 1981 citado por Monaghan, 1983), as referências a alegados prejuízos causados por estas aves são inúmeras. Estes efeitos deletérios são quase todos consequência da grande expansão que ocorreu na última metade deste século.

Da nidificação nas grandes cidades, Monaghan (1983) aponta que os principais problemas estão ligados ao ruído, provocado pelas espécies de maior porte, ao material fecal ácido e corrosivo para muitos edifícios e até o comportamento agressivo adoptado em defesa do ninho. Observou-se que conseguem não só aproximar-se do Homem, como competir vorazmente com outras aves aquáticas, ocupando os ninhos destas (Furness e Monaghan, 1987) ou exercendo predação sobre ovos e os juvenis (Monaghan, 1983).

Nas áreas correspondentes às colónias reprodutivas, observaram-se mudanças profundas nos padrões de vegetação habituais. O que sucede mais frequentemente, é a substituição da vegetação tipicamente marítima por outras espécies como consequência do aumento da acidez dos solos e pelo transporte de sementes de espécies de outros locais (Furness e Monaghan, 1987). Estas alterações também foram registadas nas Berlengas, sendo um dos factores que precipitou a adopção de medidas de controlo da população (Morais, comunic.pessoal, 1999).

Várias medidas foram utilizadas para controlar a população de várias espécies de gaivotas, sobretudo em áreas cujo seu número se tornou crítico, quer devido a conflitos com o Homem, quer devido a profundas perturbações nos ecossistemas de que fazem parte. Os métodos utilizados referidos englobam a destruição dos ninhos, a remoção de ovos ou mesmo a cozedura destes de forma a torná-los inviáveis (Monaghan, 1983).

No entanto, estas medidas revelaram ter uma eficácia muito relativa, visto estas aves possuírem a capacidade de reconstruir os ninhos, de aumentar o número de ovos postos por época reprodutiva, ou mesmo, simplesmente reproduzirem-se normalmente nas épocas seguintes.

Ducan e Monaghan (1977), citado por Monaghan (1983), provaram, recorrendo a anilhagens de aves, que mesmo quando as taxas de sucesso reprodutivo são baixas em

determinadas áreas, pode ocorrer uma dispersão inter-colónias, permitindo uma rápida reposição dos efectivos.

O mesmo foi constatado no nosso país por Morais *et al.* (1998) que, utilizando uma série de modelos matemáticos, provaram que na principal colónia portuguesa (Berlengas) de *L. cachinnans*, os fenómenos de imigração de outros indivíduos provenientes de colónias situadas na Galiza devem ter contribuído para o aumento exponencial entre 1974 e 1994.

O único método referido como eficaz no controlo da população é o abate compulsivo de aves adultas reprodutoras, aniquilando a capacidade reprodutiva para todas as épocas subsequentes (Monaghan, 1979; Morais, comunic.pessoal, 1999). No entanto, para Roch (1997, citado por Garcia) este tipo de medida só pode ser eficaz se adoptada por longos períodos de tempo.

Os primeiros controlos deste género, organizados e aprovados oficialmente começaram nos anos 60, devendo mesmo ser praticados anualmente em diversos locais, sobretudo quando o número de ninhos em zonas urbanas interfere grandemente com a actividade humana (Monaghan, 1979).

Em Portugal, este tipo de medida foi adoptada na reserva natural da Berlenga de forma a preservar uma biodiversidade ameaçada pelas quase 45.000 aves existentes em 1994 (Morais, comunic.pessoal, 1999), mesmo se a ilha pode abrigar até 120.000 aves (Vicente citado por Garcia, 1997). O abate das aves efectuou-se durante três anos consecutivos em 1994, 1995 e 1996, reduzindo a população para valores entre 12.000 e 15.000 aves. Uma das iniciativas que ainda não foi tomada após a redução da população nesta reserva natural, foi o repovoamento da vegetação endémica da ilha.

Sem qualquer tipo de medida de controlo, o número de aves levaria à invasão das cidades para a constituição de ninhos, sobretudo em telhados como já parece ocorrer na Grã-Bretanha (Monaghan, 1983; Roch citado por Garcia 1997) ou em Vigo, na Galiza como refere Vicente (1997, citado por Garcia).

1.4. Comportamento alimentar dos Larídeos.

O comportamento alimentar destas aves é uma consequência directa do carácter perfeitamente omnívoro da dieta, como das suas capacidades adaptativas. Com efeito, Cramp e Simmons (1983) afirmam mesmo poderem utilizar quase tudo para a sua alimentação desde que seja de textura e tamanho apropriado. De uma forma geral, não existem grandes diferenças nos hábitos alimentares das diferentes espécies de Larídeos mais comuns.

Aliada a estas variadas possibilidades de fontes alimentares, verifica-se uma grande versatilidade na forma como a apreensão dos alimentos pode ser feita: A alimentação pode ser feita de noite, podem mergulhar até cerca de 5-6 m de profundidade nas águas junto à costa, podem pegar em alimentos enquanto correm ou andam e por vezes deixam cair propositadamente moluscos e caranguejos para que as carapaças possam ser quebradas, sendo uma habilidade que aumenta com a idade do animal (Cramp e Simmons, 1983).

Têm a capacidade de furtar alimentos a outras aves aquáticas, nomeadamente a Anatídeos e outros Larídeos. Esta capacidade esta particularmente presente nas espécies de grande porte como o alcatraz (*Larus marinus*).

A alimentação pode estar relacionada com as marés, registando-se maior actividade na maré baixa ou quando a maré está a subir (Spaans, 1971).

Também foram registadas variações na frequência da alimentação ao longo do dia, sendo os períodos de menor actividade, a meio da manhã e a meio da tarde (Pearson, 1968).

O comportamento alimentar apresenta variações consoante a idade e a época do ano. Durante a época reprodutiva, a alimentação necessita de ser particularmente mais cuidada:

- É frequente durante a corte, um dos membros do casal oferecer alimentos ao outro, normalmente de valor nutritivo elevado (Monaghan, 1979; Brown e Ewins, 1996);
- A postura dos ovos condiciona um esforço metabólico óbvio e,

consequentemente, a necessidade de um aporte calórico suplementar para as fêmeas. Com efeito, quando existem carências alimentares, o comportamento do macho e da fêmea são ajustados por forma à fêmea não despender energia a procurar alimento, aumentando o aprovisionamento por parte do macho e mantendo a taxa de produção de ovos a um nível normal (Monaghan, 1992);

- A alimentação dos juvenis, que depende durante bastante tempo nos progenitores, deve ser superior em termos qualitativos, sobretudo no primeiro mês de vida, exigindo a escolha cuidada das fontes proteicas e o aporte equilibrado em fosfato de cálcio (Bukacinska *et al.*, 1996; Morais e Vicente, 1995). Alguns estudos comprovaram estes factos, como o de Nogales *et al.* (1995), visto estes autores, não terem observado, em 125 regurgitações de juvenis de *Larus argentatus* com idade inferior a 4 semanas, alimentos provenientes de lixeiras. Também Brown e Ewins (1996) estudaram a dieta de juvenis de *L. delawarensis*, sendo esta composta por vermes (50%) e por peixe (44%), enquanto, nos adultos, 67% do material ingerido era proveniente de lixeiras. No nosso país, Morais e Vicente (1995) analisaram 55 regurgitações de juvenis não voadores de *L. cachinnans*, sendo 78,18% constituída por peixe de diferentes espécies.

Monaghan (1992) refere-se a importância da alimentação em todas as fases do processo reprodutivo, afirmando que quando existem grandes carências, muitas espécies respondem abstendo-se de se reproduzir.

Hunt (1972), Monaghan (1992) e Bukacinska *et al.* (1996) frisaram, nos seus trabalhos, a importância da proximidade da principal fonte alimentar na época reprodutiva para a sobrevivência dos juvenis, visto que, após a eclosão dos ovos, um dos adultos do casal tem que permanecer no ninho para afugentar eventuais predadores, enquanto o outro indivíduo vai procurar alimento.

O Inverno, devido à escassez de alimento, constitui a época do ano com maior índice de mortalidade. Este facto têm sido contrariado pela adaptabilidade a novas fontes de alimento relativamente às tradicionais, resultando em taxas de sobrevivência de 85 a 96% de um ano para o outro quando o alimento está disponível (Cramp e Simmons, 1983). Estão incluídos, subprodutos da indústria pesqueira, subprodutos ou efluentes

agrícolas, resíduos sólidos urbanos e industriais (por exemplo, matadouros), entre outros.

Muitos trabalhos indicam que as novas fontes alimentares destas aves, nomeadamente as lixeiras, constituem elementos altamente condicionadores e influenciadores da dinâmica de algumas populações de Larídeos.

Com efeito, inúmeras referências aludem à importância que o fornecimento de alimentos provenientes directamente ou indirectamente da actividade humana têm na dieta destas aves, atestando uma correlação directa com a sobrevivência de juvenis/ sucesso reprodutivo, ou a influência profunda nos padrões de distribuição geográfica invernal de muitas espécies, alterando as taxas de mortalidade esperadas (Hunt, 1972; Monaghan, 1992; Pons, 1992 e Brown *et al.*, 1996 para *L. argentatus* e *L. fuscus*; Sol *et al.*, 1995 e Morais *et al.*, 1998 para *L. cachinnans*).

Alguns autores indicam a inevitabilidade deste tipo de comportamento alimentar, constituindo uma questão de sobrevivência: Para Bukacinska *et al.* (1996), a pressão crescente de uma população cada vez mais numerosa resultou na procura destas fontes de alimento menos nobres, devido à escassez dos recursos habituais; Também Sol *et al.*, (1995) referem que o grau de dependência neste tipo de alimentação é proporcional ao grau de urbanização, visto a população humana interferir com os recursos naturais habituais (alimento, habitat, perturbação de nichos ecológicos). Também as condições meteorológicas, nomeadamente o mau tempo no mar, favorecem a procura de novas fontes alimentares no interior da costa (Monaghan, 1992).

Existem igualmente referências relativas a populações de gaivotas que não recorrem a este tipo de alimentação (Spaans, 1971; Coulson e Butterfield, 1986; Mudge *et al.*, 1982 e Kilpi *et al.*, 1983 citados por Sol *et al.*, 1995).

Morais (comunic. Pessoal, 1999) refere que a alimentação em lixeiras constitui muitas vezes um último recurso quando as outras fontes de alimento escasseiam. Quando alimentos de alto valor calórico são necessários, a escolha é cuidada. Por exemplo, no caso da alimentação de juvenis não voadores na Berlenga, não parece ser por acaso que a espécie de peixe mais consumida seja a Galeota-menor (*Ammodytes tobianos*), uma espécie cujo valor nutritivo é elevado (Morais e Vicente, 1995).

No nosso país, além do recurso a lixeiras, estas aves são frequentemente avistadas perto de portos de pesca. Morais *et al.* (1998) referem que, na zona de Peniche, grandes quantidades de peixe de fraco valor comercial são fornecidos às gaiivotas pelos pescadores. Também algumas actividades do sector pecuário, nomeadamente suiniculturas e seus efluentes, presentes em toda a região em redor de Torres Vedras, constituem locais de atracção para estes Larídeos (Morais, comunic.pessoal,1999).

As lixeiras são, sem dúvida, as fontes de alimentos que revelam a importância da interferência do Homem na dinâmica destas populações. Em certos casos, nomeadamente numa zona dos Estados Unidos, Hunt (1972) provou que a sobrevivência de juvenis de *L. argentatus* era maior nas colónias existentes em ilhas mais próximas da costa e, por consequente, mais perto de lixeiras.

O estudo de Sol *et al.* (1995) mostra, da mesma forma, uma correlação estatística positiva entre a presença de *Larus cachinnans* em determinadas áreas e a presença de lixeiras, enquanto outros factores como a distância do mar, a quantidade de lixo ou quantidade de peixe neste último não revelaram ter qualquer influência.

Também na Bretanha, em França, uma diminuição drástica do número de aves verificou-se após o encerramento de algumas fontes alimentares de fácil acesso, como lixeiras a céu aberto (Pons, 1992).

1.5. O impacto das aves silvestres sobre a sanidade

Existe desde há longos anos, uma crescente preocupação pelos reservatórios silvestres de agentes infecciosos para o Homem e outros animais, numa tentativa de integrar todos os factores intervenientes nas complexas conexões epidemiológicas de cada uma das patologias. Esta preocupação é redobrada no caso das aves devido à sua extrema mobilidade, com especial ênfase nas espécies migradoras, em que imperativos fisiológicos obrigam a grandes deslocações, por vezes mesmo intercontinentais.

Já na década de 1950, alguns autores ingleses suspeitaram aves migradoras no aparecimento de focos localizados de febre aftosa em alguns pontos da costa Britânica e Nordeste Francês, utilizando comparações do padrão de distribuição dos surtos de doença

com os de deslocação de certas aves (Wilson e Matheson, 1952). Sabe-se que mesmo nesta época, a Grã-Bretanha já praticava uma profilaxia sanitária severa no combate desta afecção, sendo hoje em dia considerada um país livre deste tipo de virose. Com efeito, o aparecimento de focos bem delimitados, mesmo após medidas de controlo drásticas, levantou suspeitas intrigantes acerca do papel de aves migradoras.

Relativamente às zoonoses, existe uma crescente preocupação que recaí sobre aves cujo habitat se sobrepôs, de alguma forma, com as actividades humanas, em particular nas espécies que partilham habitats urbanos como os pombos (*Columba livia* var. *domestica*) ou os pardais (*Sturnus vulgaris*), entre outras, justificando diferentes estudos sobre a prevalência de *salmonella* spp. e outras enterobactérias (Rodeia *et al.*, 1994; Casanovas *et al.*, 1995; Cízek *et al.*, 1994, Hubálek *et al.*, 1995; Palmgren *et al.*, 1997; Kamel *et al.*, 1997)

Também os corvos (*Corvus corone cornix*) têm sido implicados como portadores de enterobactérias com potencial zoonótico, nomeadamente *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (Kapperud e Rosef, 1983). Esta espécie também tem sido avistada a alimentar-se em lixeiras perto de centros urbanos.

Nos pombos, existem estudos em que as prevalências de *Salmonella* spp. são extremamente variáveis, mesmo em ambiente urbano onde se poderiam prever, valores elevados repetidamente.

No estudo efectuado por Rodeia *et al.* (1994), na cidade de Lisboa, encontraram-se 18% de amostras de fezes de pombos positivas. No entanto, outros estudos demonstraram que podem existir prevalências de *Salmonella* spp. mais baixas nos pombos. Com efeito, Casanovas *et al.* (1995), encontraram, em 400 amostras cloacais de pombos na cidade de Barcelona, durante um período de 12 meses, apenas 6 amostras positivas para *Salmonella* spp., correspondendo a uma frequência de 1,5% apenas, comparativamente à frequência calculada para *Campylobacter jejuni* (26,2%), na mesma população.

Existem alguns indícios que as aves carnívoras e insectívoras serão portadores maiores de salmonelas relativamente às outras aves. Osman (1965) estudou a disseminação de enterobactérias de potencial zoonótico em aves migradoras, num estudo que não compreendeu qualquer espécie de Larídeo, mas encontrou amostras positivas para *Salmonella* spp. em fezes de falconiformes e de mocho (*Otus scops*), em que a dieta é

principalmente constituída por proteínas de origem animal. A contaminação por salmonelas poderá ser favorecida pela necrofagia de algumas espécies, nomeadamente a alimentação através de cadáveres de roedores, potenciais portadores, por sua vez, de salmonelas.

Também Kirkpatrick e Trexler-Myren (1986), estudaram a prevalência de *Salmonella* spp. em Falconiformes perto da cidade de Nova Jersey (E.U.A), encontrando prevalências baixas: apenas duas aves pertencentes à espécie *Buteo jamaicensis*, em 105 amostras, foram positivas (1,9%).

Não somente a transmissão de agentes patogénicos com potencial zoonótico tem sido considerada quando se avalia o papel das aves silvestres na sanidade ambiental. Com efeito, existem numerosas espécies animais que entraram em conflictualidade com o Homem, sobretudo quando existem crescimentos populacionais desmedidos com consequente invasão de novas áreas. No caso dos Larídeos, têm sido referidos o aumento da poluição sonora em certas localidades, bem como a deterioração dos edificios devido à corrosividade dos seus excrementos. Estes problemas não se revelam diferentes dos encontrados com outras espécies que habitam as cidades. A capacidade de revelarem uma feroz defesa dos ninhos, podendo comportar-se de forma muito agressiva para quem ousa aproximar-se, também contribuiu para uma diminuição da popularidade das gaivotas em certas localidades (Monaghan, 1983).

Quando são efectuadas pesquisas de *Salmonella* spp., os Larídeos aparecem invariavelmente, de todas as aves silvestres, os portadores mais regulares, revelando por vezes serem as únicas aves portadoras em estudos que envolvem outras espécies: Kapperud e Rosef (1983), estudaram a prevalência de *Salmonella* spp. em cerca de trinta espécies de aves silvestres, ou ainda no estudo de Palmgren *et al.* (1997), em que foram testadas 8 espécies diferentes, só sendo positivas, em ambos os estudos, as amostras provenientes dos Larídeos.

Noutros trabalhos ainda, a prevalência de infecção nos Larídeos é superior às outras espécies: Hubálek *et al.* (1995) encontraram, após análise de zaragoas cloacais de 57 espécies de aves, 25% de amostras positivas nas espécies de Larídeos analisadas, enquanto isolaram apenas uma amostra positiva nos Anseriformes (*Anser anser*), correspondendo a 0,6% de positividade para este grupo, e uma amostra positiva nos Ralliformes (*Fulica atra*) correspondendo a 9,1% de positividade.

Nos estudos em que apenas foram testados Larídeos, as investigações revestem-se com o objectivo de correlacionar o seu papel como portadores de agentes patogénicos com o comportamento alimentar ou a sua proximidade com fontes contaminadas, quer ainda com a incidência das infecções estudadas nos humanos e animais de interesse pecuário.

Além de enterobactérias, estas aves também foram implicadas na transmissão de larvas de *Cysticercus bovis* (Crew, 1967) ou ainda na dispersão entre países de algumas rickettsias (Olsen *et al.*, 1995).

Vários autores implicaram ao Larídeos na degradação de águas para consumo humano, correlacionando os teores de coliformes totais e fecais, estreptococos fecais e *Clostridium perfringens* em águas povoadas por estas aves (Gould e Fletcher, 1978; Benton *et al.*, 1983). Outros autores correlacionaram a degradação de águas de recreio, através de contagens de coliformes, com a presença destas aves (Lévesque *et al.*, 1993).

Este último trabalho revelou *Aeromonas* spp. nas fezes das gaivotas examinadas. Este género bacteriano pode dar origem a infecções nos humanos, sobretudo quando a pele se encontra lesionada. Encontra-se também largamente documentado as infecções em algumas espécies piscícolas, causando alguns prejuízos nas aquaculturas, mesmo se estes autores não o correlacionaram com este tipo de actividade.

Mais recentemente, o envolvimento dos Larídeos na transmissão de agentes zoonóticos importantes, como *Listeria* spp., tem sido demonstrada (Quessy e Messier, 1992; Guerra *et al.*, 1999).

Também comparativamente aos outros animais presentes no ecossistema marinho, os Larídeos parecem ser portadores mais frequentes de *Salmonella*. Minette (1986) refere a existência de investigações, acerca das salmoneloses em meio marinho, que provam a existência de alguns animais marinhos, incluindo reptéis, cetáceos, peixes, crustáceos e aves marinhas. Estas infecções não parecem ter um significado epidemiológico relevante, sendo a maior parte relacionadas com surtos esporádicos de salmoneloses humanas. Na maioria dos casos, estes animais não apresentam qualquer tipo de sintomatologia. Por vezes, o agente é isolado de animais cuja etiologia da doença ou da morte foi diferente, sendo neste caso uma infecção oportunista, provando que não se trata de uma bacteriose tradicionalmente muito frequente no meio marinho, devendo ser maioritariamente devido a contaminações por resíduos das actividades humanas, como parece também indicar a

contaminação das gaivotas.

Certos autores pensam que a presença de *Campylobacter* spp. em muitas aves decorre do facto de este microrganismo integrar muitas vezes a flora intestinal normal enquanto outras bactérias, como as salmonelas e *Yersinia* spp., encontram-se apenas esporadicamente no intestino destas aves (Kapperud e Rosef, 1983). Desta forma, o estudo da presença de *Salmonella* spp. em aves silvestres e nomeadamente em aves marinhas poderá reflectir a contaminação destas áreas, avaliando quer o impacto das populações de Larídeos sobre a sanidade ambiental, como eventualmente a sua possibilidade de serem adoptados como modelos reflectores desta mesma sanidade. No presente estudo, escolheu-se para avaliar o impacto destas aves na sanidade, o agente zoonótico que se transmite provavelmente de forma mais assídua das aves para o Homem, concretamente as salmonelas.

Neste contexto, não se pode deixar em claro, as diferentes componentes epidemiológicas precipitantes da contaminação dos Larídeos. Com efeito, as interacções são de tal forma complexas, com componentes ambientais fortíssimas, que se torna imperativo elucidar a possibilidade destas aves desempenharem um papel activo na epizotologia destas infecções ou meramente passivo como reflectores da contaminação do seu habitat.

A crescente perturbação causada pelo Homem, sobre o ambiente marinho, levou mesmo a reavaliar o papel de certas aves silvestres na transmissão de agentes zoonóticos, responsabilizando o Homem pela infecção directa de algumas aves: Olsen *et al.* (1995), num exemplo que se pode considerar caricato, estudaram, no continente Antártico, o papel do Homem como portador e disseminador de *Salmonella* spp. para a fauna endémica, nomeadamente para os pinguins residentes.

CAPÍTULO II- BIOLOGIA E ECOLOGIA DO GÉNERO *SALMONELLA*

Lignières, 1900

As salmonelas são enterobactérias, do qual se conhecem mais de 2800 serovariedades, mas 99,9% pertencem a uma única espécie, *Salmonella enterica* (LeMinor, 1984; LeMinor,1987). Praticamente todas as serovariedades reconhecidas como patogénicas para os mamíferos e aves pertencem à subespécie I (*Salmonella enterica enterica*).

Face à dificuldade resultante da falta de acordo quanto à definição de uma espécie tipo, consideraremos, para efeitos de descrição, os princípios estabelecidos no Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Le Minor, 1984), 9ª edição. Não será deixado em claro, no entanto, os conhecimentos actuais do problema taxonómico, recorrendo ao uso de uma terminologia moderna sempre que se justificar.

Por se configurar relevante para a finalidade deste trabalho assinalam-se alguns dos actuais conhecimentos sobre a biologia deste género.

2.1. Definição

Salmonella é um género bacteriano da família das *Enterobacteriaceae*; Bastonete Gram-negativo (0,7 a 1,5 por 2 a 5 µm), anaeróbio facultativo, em regra móvel (com excepção de *S. Pullorum*); com flagelos peritricos; multiplica-se facilmente em meios de cultura simples contendo peptona ou extracto de carne, originando ao fim de vinte horas de incubação a 37°C colónias de 2 a 3 mm de diâmetro.

2.2. Características bioquímicas

As culturas puras revelam-se oxidase-negativas, catalase-positivas, redutoras do nitrato a nitrito e do tetrionato a tiosulfato e este a sulfureto, não hidrolizam a ureia, nem desaminam a fenilalanina ou o triptofano (indol negativas), não possuem lipases nem desoxiribonucleases, possuem ornitina e lisina descarboxilases e utilizam o citrato e não o malonato como fonte de energia. Em relação a capacidade fermentativa dos glúcidos,

utilizam a D-glucose, produzindo gás, sendo geralmente sacarose, inositol e lactose negativas. Alguns serotipos pertencentes à subespécie III têm capacidade de fermentar a lactose, no entanto, nos serotipos pertencentes à subespécie I (a mais importante), o carácter lactose-positivo é de natureza plasmídica.

2.3. Taxonomia

A taxonomia das *Salmonella* tem sido, ao longo deste século, envolvida em numerosas disputas e controvérsias que ainda perduram e cuja descrição exaustiva ultrapassa o âmbito do nosso trabalho. À medida que o conhecimento de novas técnicas e metodologias para a classificação bacteriana foi evoluindo, as bases para a taxonomia do género foram alteradas. Resumidamente, verificou-se que a taxonomia das *Salmonella* evoluiu baseando-se (LeMinor *et al.*, 1987):

1. Nas diferentes formas clínicas que a infecção salmonélica poderia causar e/ou a espécie animal donde foi isolada como por exemplo *S. cholera-suis*, *S. abortusequi*, *S. typhi* ou *S. pullorum*;
2. Nas especificidades antigénicas, através da análise dos antígenos O e H (esquema de White e Kauffmann, resultando na descrição de mais de 2100 serovarietades);
3. Nas propriedades bioquímicas, catalogando e reagrupando as diferentes serovarietades, reduzindo desta forma o número de espécies: Neste contexto, Kauffmann propôs a divisão do género *Salmonella* em 4 subgéneros (I a IV), bioquimicamente definidos;
4. Por último, com base nas técnicas de hibridação DNA / DNA, evidenciando uma correlação entre subgéneros superior a 70%, confirmando que todas as serovarietades de *Salmonella* constituem uma única espécie.

Decorrendo destes últimos estudos, LeMinor *et al.*, em 1987 propuseram sete subespécies em vez dos subgéneros, igualmente distinguíveis bioquimicamente e correlacionadas com os subgéneros já propostos por Kauffmann, excepto para o subgénero III, que se divide em duas subespécies, respectivamente IIIa (serovarietades

monofásicas) e IIIb (serovarietades bifásicas) e a caracterização de duas subespécies adicionais (V e VI).

Nos últimos anos, a subespécie V, *Salmonella enterica* sub. *bongori* tem vindo a ser considerada uma espécie à parte.

A subespécie I contém a maioria das salmonelas tipicamente patogénicas para os Mamíferos e Aves. As subespécies II e III são frequentemente isoladas de animais poiquilotérmicos, nomeadamente répteis. As subespécies IV e V encontram-se no meio ambiente e raramente foram associadas a patologias de qualquer espécie animal.

No quadro 2.3.1., estão representados os sete fenotaxons cuja diferenciação pode ser efectuada com base nas características bioquímicas indicadas.

QUADRO 2.3.1.- Perfis bioquímicos discriminativos das subespécies de *Salmonella* (*S. enterica*, Kauffmann, 1952) (Le Minor e Popoff, 1987).

CARACTERES	I <i>enterica</i>	II <i>salamae</i>	IIIa <i>arizonae</i>	IIIb <i>diarizonae</i>	IV <i>houtenae</i>	V <i>bongori</i>	VI <i>indica</i>
Dulcitol	+	+	-	-	-	+	d
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	+	d
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	-	+
Solbitol	+	+	+	+	+	+	-
KNC	-	-	-	-	+	+	-
L+Tartarato	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
γ -glutamytran	+	+	-	+	+	+	+
β -glucuronid	d	d	-	+	-	-	d
Mucato	+	+	+	-	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	-	d
Lise fago O1	+	+	-	+	-	d	+

LEGENDA: + reacção positiva
 - reacção negativa
 d reacção variável

Ainda segundo Le Minor *et al.* (1987), a designação da espécie tipo não deverá ser no futuro *Salmonella cholera-suis*, Lignières, 1900, mas antes, *Salmonella enterica*, Kauffmann, 1952, que corresponde a *Salmonella* Typhimurium estirpe LT2 (CIP6062).

2.4. Estrutura antigénica

Como se descreve anteriormente, a espécie *Salmonella enterica* encontra-se dividida em várias subespécies, estas últimas catalogadas por serotipos em função dos antígenos que possuem.

2.4.1. Antígenos somáticos

A parede celular de todas as bactérias Gram-negativas é constituída por uma membrana externa, uma camada fina (comparativamente às bactérias Gram-positivas) de peptidoglicano e uma membrana citoplasmática. As duas primeiras encontram-se tão fortemente ligadas que podem ser dissociadas das restantes estruturas como uma só unidade.

A membrana externa é a estrutura da parede celular de maior importância em termos imunológicos. Um dos seus componentes é o lipopolissacárido (LPS), constituído por três partes:

- O lípido A (muitas vezes com propriedades tóxicas);
- Um core de natureza mucopolissacárida;
- A cadeia lateral O ou antígeno O (constituída por uma cadeia polissacárida curta).

A natureza dos glúcidos deste último constituinte e as ligações que estabelecem entre si permitem a diferenciação em diferentes grupos antigénicos (serotipificação) e a determinação das formas S de “smooth” e das L (Le Minor *et al.*, 1982).

Os antígenos O representam as endotoxinas da *Salmonella*, sendo termoestáveis e álcool-resistentes. De acordo com o seu grau de especificidade, os diferentes antígenos O podem ser classificados em:

- Maiores, se identificam o grupo somático, por exemplo O:4 do grupo B, O:9 do grupo D;
- Menores, se não se revelarem suficientes para caracterizar um grupo, sendo comuns a vários, por exemplo o O:1 e o O:12.

Estão descritos igualmente, antígenos O cuja expressão depende conversão lisogénica por bacteriófagos (por exemplo o grupo E3).

Em culturas envelhecidas, certas bactérias podem perder o LPS, passando à forma R de “rough” ou rugosa, impossibilitando desta forma a especificação do antígeno O e, conseqüentemente, a serotipificação.

2.4.2. Antígenos capsulares

As cápsulas bacterianas são estruturas bem organizadas, geralmente compostas por mucopolissacáridos e localizadas externamente à parede celular.

No género *Salmonella*, só é conhecido um antígeno capsular: o antígeno K ou Vi de “virulência”. Está presente apenas nas serovarieties Typhi, Paratyphi (exclusivamente humanas) e Dublin. Quando se utilizam soros, a aglutinação Vi é mais intensa de que a aglutinação O.

Igualmente externas à parede celular, existem outras estruturas denominadas fimbrias ou pili. São de natureza proteica, mais finas que os flagelos mas não se encontram envolvidas na motilidade. Certos pili, mais espessos do que o normal, desempenham um papel indispensável na conjugação bacteriana e a sua codificação genética é habitualmente de natureza plasmídica.

2.4.3. Antígenios flagelares

Os flagelos são apêndices que emergem da célula bacteriana, utilizados na motilidade e compostos por três segmentos:

1. O filamento, o mais comprido e constituído por uma única proteína, a flagelina;
2. O corpo basal, unidade motora situada na membrana citoplasmática;
3. O gancho, flexível, que liga o filamento ao corpo basal.

Os antígenios flagelares, ou antígenios H, correspondem aos diferentes tipos de flagelinas, sendo a sua composição em ácidos aminados constante para um antígeno específico. Devido a esta composição, os antígenios flagelares podem ser desnaturados pelo calor e pelo álcool.

A maioria das *Salmonella* apresentam duas fases flagelares (difásicas), como por exemplo, *S.Typhimurium*. Existem outras que apresentam apenas uma fase flagelar (monofásicas), como, por exemplo, alguns serotipos da subespécie I, *Enteritidis*, *Derby* ou *Agona*.

Habitualmente, a fase 1 é designada por uma letra (de *a* a *z* e *z1* até *z23*.) e a fase 2 por um número.

2.5.Nomenclatura

Após 1966, convencionou-se que, apenas os serotipos da subespécie *enterica* seriam denominados por um nome, habitualmente a área geográfica de onde foram isolados pela primeira vez. Os serotipos pertencentes as restantes subespécies, seriam discriminados através da respectiva fórmula antigénica.

O esquema de Kauffmann e White estabelece a nomenclatura dos serotipos pela suas fórmulas antigénicas. A classificação é efectuada através dos antigénios O, anexando desta forma o serotipo a um dos grupos somáticos. Dentro de cada grupo, são seguidamente caracterizados os antigénios flagelares de fase 1 e de fase 2. Os factores ligados aos antigénios somáticos resultantes de lisogenização aparecem sublinhados e os factores acessórios, não relacionados com a presença de bacteriófagos são escritos entre parêntesis rectos.

Importa esclarecer que, em inúmeras situações, os diferentes serotipos são largamente utilizados como forma de comunicação, relevando-se úteis neste contexto, no entanto, não têm lugar na nomenclatura e não podem ser confundidos com espécies diferentes (Bergey, 9ª edição). Desta forma, o “International Journal of Systematic Bacteriology” (1987) determina que, para a subespécie I, os serotipos devem ser escritos em letras romanas e não em itálico, começando por uma letra maiúscula.

2.6. Ecologia de *Salmonella* spp.

As *Salmonella*, tal como a maioria das *Enterobacteriaceae* estão distribuídas por todo o mundo e por um vastíssimo número de espécies animais. A maioria é parasita intestinal de vertebrados homotérmicos, causando infecções clínicas ou latentes, estando também descritos em répteis e em invertebrados.

Embora não sejam bactérias ubiqüitárias exclusivas, torna-se frequente o seu isolamento em inúmeros meios devido à grandeza e variedade deste reservatório animal. No meio ambiente, foram encontradas, desde há algum tempo, contaminações por *Salmonella* com alguma regularidade, em cursos de água (Kampelmacher e Jansen, 1973; Wray, 1975), em pastagens (Taylor *et al.*, 1971) e no solo (Thomason *et al.*, 1977)

A viabilidade das *Salmonella* no organismo hospedeiro e no meio exterior é condicionada pelo determinismo ecológico envolvente, por factores abióticos e bióticos: os primeiros de natureza físico-química (temperatura, pH, pressão osmótica, composição do substrato, da atmosfera e radiações), os segundos respeitam à presença de outros germes competidores e à susceptibilidade dos Hospedeiros. Os factores genéticos inerentes a cada estirpe têm grande influência na sobrevivência a condições adversas, além de determinarem resistências a metais pesados, antibióticos, entre outros.

2.6.1. Factores físico-químicos gerais

O espectro térmico onde ocorre desenvolvimento das salmonelas está compreendido entre 5°C e os 46°C, estando o óptimo situado entre 35 e 43°C, sendo por este motivo consideradas termotróficas. A temperatura óptima para o crescimento não é a mesma para todas as serovariedades.

O pH óptimo para o desenvolvimento das *Salmonella* está situado próximo da neutralidade, admitindo valores entre os 4,7 e 8,85.

A actividade da água mínima necessária para o seu desenvolvimento é 0,945, sendo os valores mais favoráveis acima dos 0,980.

Comparativamente a outras bactérias patogénicas para o Homem encontradas na água, como *Vibrio* spp., *Shigella* spp. ou *Campylobacter* spp. as *Salmonella* são as mais frequentemente isoladas de amostras recolhidas no meio ambiente.

2.6.2. Sobrevivência das salmonelas em resíduos sólidos e efluentes

A maior parte dos estudos efectuados sobre as condições mais favoráveis ao desenvolvimento das salmonelas, em meios inertes, interessam grandemente à indústria alimentar e de restauração de forma a serem integrados em planos de controlo de riscos para a Saúde Pública. Também no caso das explorações pecuárias, com particular ênfase às actividades em que os prejuízos causados pelas salmoneloses se averiguam avultados, todos os aspectos inerentes à epidemiologia destas infecções, das quais constituem uma parte importante a sobrevivência dos microrganismos e todos os parâmetros directamente envolvidos, encontram-se largamente estudados e documentados.

Nos aspectos relativos à sanidade do meio ambiente e à presença de *Salmonella* spp., muitas vezes decorrentes das actividades humanas aqui referidas, o número de estudos efectuados é consideravelmente menor, talvez pela maior dificuldade em estabelecer como possíveis causas de salmoneloses, as fontes ambientais.

A presença de salmonelas e a sua sobrevivência em resíduos sólidos e efluentes urbanos, industriais e agrícolas, tem sido documentada. Sabendo de antemão que existe a possibilidade de estes serem adoptados como fonte alimentar por parte das gaivotas, importa esclarecer em que medida existem salmonelas nestes resíduos e qual a sua sobrevivência nestes substratos.

Num estudo acerca da sobrevivência de *S. Typhimurium* em fezes de animais, Mitscherlich e Marth (1984b), concluíram a partir de diferentes investigações que, o período de sobrevivência é maior quanto:

- Mais elevada for a temperatura (dentro de um espectro aceitável);
- Menor for a exposição solar;
- Maior for a humidade relativa.

No caso das águas residuais, da água para consumo humano e das águas de recreio, muitas vezes não são pesquisados agentes patogénicos específicos, utilizando microrganismos indicadores de contaminação fecal com avaliação indirecta da possível presença destes agentes. Certas investigações alertam para a possibilidade de microrganismos como *Salmonella* spp. poderem estar presentes em diferentes fases do tratamento das águas (Danielsson, 1977; Fenlon 1981 e 1983).

Em inúmeras ocasiões, as salmonelas podem revelar uma elevada resistência aos processos de tratamento das águas residuais. Danielsson (1977) demonstrou que *Salmonella* Enteritidis possui, em certas condições, maior capacidade de resistência ao cloro do que *Escherichia coli*. Com efeito, muitos dos estudos efectuados sobre a resistência de bactérias patogénicas ao cloro foram efectuados em água destilada, não tomando em consideração factores tão importantes como o pH, que pode aumentar o tempo de resistência comparativamente aos coliformes indicadores.

Também devido a *Salmonella* spp. ser um germe anaeróbio facultativo, a sobrevivência através dos processos de digestão anaeróbia e de oxidação aeróbia, característicos dos processos de tratamento de águas residuais, encontra-se grandemente facilitada em relação a outros germes. Danielsson (1977) refere existir evidências da viabilidade das salmonelas após o processo de digestão anaeróbia, bem como a sobrevivência de cerca de três semanas nos processos aeróbios.

2.6.3. Sobrevivência na água do mar

Na água do mar, a presença de *Salmonella* spp. deve-se maioritariamente a descargas de efluentes. A maior parte das bactérias não se encontram em locais afastados dos pontos de descarga, indicando que a maior parte é encaminhada para os sedimentos logo após a descarga (Zobell, 1946 e Weiss, 1951 citado por Mitscherlich e Marth, 1984a). As *Salmonella* podem sobreviver nestas condições até um ano, sobretudo se o sedimento for rico em matéria orgânica (Feacham *et al.*, 1933). A sobrevivência neste meio depende pois, em menor grau, de factores de competição bacteriana, mas sim de outros dos factores de stress encontrados, nomeadamente o aumento da osmolaridade, a oligotrofia, a redução da temperatura, a luz solar e a predação.

Mitscherlich e Marth (1984a) afirmam, ao contrário do que seria previsto que, nestas condições, a sobrevivência bacteriana é inversamente proporcional ao acréscimo da temperatura, existindo um declínio máximo nos meses de Verão e prolongamento do tempo de sobrevivência nos meses de Inverno. No entanto, um estudo efectuado em água do mar na costa Espanhola, revelou não existirem diferenças na percentagem de isolamentos devido a oscilações de temperatura (Alonso *et al.*, 1992).

A presença de *Salmonella* spp. pode ser frequente em águas perto de centros urbanos, existindo evidências de estar correlacionada com outros índices de contaminação fecal, mesmo se este meio lhe for particularmente hostil. Comparativamente aos outros ecossistemas aquáticos, a sobrevivência parece ser consideravelmente menor na água do mar: Gledel (1984) aponta 3 a 11 dias para a água do mar e 1 a 4 meses para as águas doces, no caso de *S. Derby*.

A luz solar é apontada como um dos principais factores bactericidas na água do mar. Comparativamente a outros agentes infecciosos para o Homem, incluindo virus e outras enterobacteriaceas, *S. Typhi* é um dos organismos menos resistente à acção dos raios U.V. (Bitton *et al.*, 1994). No entanto a sua acção no meio marinho encontra-se limitada muitas vezes ao primeiro metro de profundidade.

Devido a todos estes factores adversos aqui descritos, Roszak *et al.* (1983) demonstraram que *S. Enteritidis* perdia a capacidade de ser cultivável nos meios convencionais ao fim de 48 horas em água doce (água de rio). Também Dupray *et al.* (1997) demonstraram existir diferenças significativas entre o número de *Salmonella* viáveis mas não cultiváveis (através do método de contagem microscópica de bactérias com potencial respiratório) e as cultiváveis. Desta forma, pensa-se que os métodos tradicionais de detecção de microrganismos enteropatogénios na água do mar possa conduzir a subestimações importantes favorecendo um estado “viável mas não cultivável”. No entanto, podem permanecer intactos os mecanismos infecciosos para qualquer espécie susceptível que contacte com águas contaminadas, incluindo os Larídeos.

CAPÍTULO III- PESQUISA DE *SALMONELLA* EM LARÍDEOS

3.1. Objectivos

O trabalho experimental desta dissertação teve como objectivo geral, demonstrar a possibilidade de aves marinhas do género *Larus* serem portadoras e excretoras de *Salmonella*. Atendendo ao comportamento alimentar das gaivotas estabelecidas nas zonas ribeirinhas Portuguesas e às eventuais repercussões que as alterações de carácter sanitário com impacto ambiental acarretam nas respectivas excreções de germes patogénicos, procedeu-se ao rastreio de *Salmonella* spp. em sub-populações de gaivotas, com os seguintes objectivos:

- Determinar o índice de excreção de *Salmonella* spp. em sub-populações de Larídeos num determinado período de tempo;
- Avaliar os impactos que as condições sanitárias ambientais podem ter no índice de excreção fecal de *Salmonella* em gaivotas;
- Estudar a eventual relevância epidemiológica das populações de gaivotas na excreção, dispersão e propagação de *Salmonella* em espaços públicos (praias);
- Testar a eventual validade do modelo de estudo como indicador *in vivo* de sanidade ambiental .

A forma encontrada para avaliar o estado de portador e disseminação para o meio ambiente foi pesquisar a presença do agente patogénico no material fecal destas aves, excretado em quantidade apreciável para as praias.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Amostragem

Procedeu-se à colheita de 306 amostras de fezes de gaivotas em 5 praias da zona de Lisboa particularmente ricas em bandos.

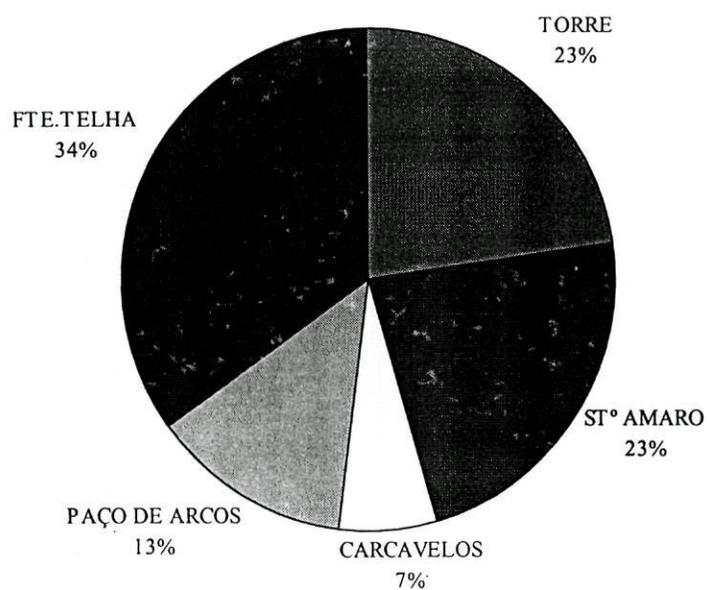
Foram igualmente recolhidas amostras de areia (4) e de água (5) de forma não sistemática e unicamente nas praias de Santo Amaro de Oeiras e de Carcavelos. Estas duas praias possuem efluentes de água doce que desembocam para a areia e para o mar e, para os quais, drenam águas residuais doutros pontos dos concelhos de Oeiras e Cascais. Estes efluentes são respectivamente a Ribeira da Laje para a praia de Santo Amaro de Oeiras e o emissário de Sassoeiros para a praia de Carcavelos. As colheitas de areia e de água foram efectuadas nestes dois locais em que poderia haver contaminação de enteropatógenos por estes efluentes, constituindo desta forma um controlo negativo, visto por vezes revelar-se impossível efectuar colheita de material fecal sem areia e/ou água.

Os cinco pontos de colheita foram os seguintes:

- - Praia da Torre (concelho de Oeiras): 5 sessões de colheita e 70 amostras;
- - Praia de Santo Amaro (concelho de Oeiras): 6 sessões de colheita e 74 amostras;
- - Praia de Carcavelos (concelho de Cascais): 3 sessões de colheita e 24 amostras;
- - Praia de Paço de Arcos (concelho de Oeiras): 1 sessão de colheita e 40 amostras;
- - Praia da Fonte da Telha (concelho do Seixal): 3 sessões de colheita e 107 amostras.

A distribuição destas amostras pelos 5 pontos anteriormente referidos encontra-se representada na figura 3.2.1.1.

FIGURA 3.2.1.1.- Distribuição das frequências das amostras pelos cinco pontos de colheita



Totalizaram-se 18 sessões de colheita, nos diferentes pontos anteriormente mencionados, entre Dezembro de 1997 e Agosto de 1998 como se pode verificar no quadro 3.2.1.1., recolhendo um total de 306 amostras de fezes imediatamente após as aves terem defecado para a areia. Para o efeito, utilizaram-se sacos esterilizados (Seward Laboratory Stomacher), recolhendo para cada um deles aproximadamente cinco gramas de material fecal, com um mínimo de água e areia. Os sacos foram fechados e colocados em mala térmica, sendo transportados com a maior brevidade para o laboratório, nunca excedendo 2 horas.

Procedeu-se de forma idêntica para as colheitas de areia (4 amostras).

A colheita de amostras de água (5) foi feita para recipientes de vidro esterilizados, da seguinte forma:

- Na praia de Carcavelos, foi recolhida água do mar na zona de junção do emissário de Sassoeiros;
- Na praia de Santo Amaro de Oeiras, foi recolhida água em três pontos diferentes, água da Ribeira da Laje, água salobra na zona de junção com o mar e água do mar a cerca de 50 metros a Leste.

QUADRO 3.2.1.1.-Data de colheita dos 18 lotes, localização e nº de amostras por lote.

COLHEITA	DATA	PRAIA	Nº AMOSTRAS de Fezes	Nº AMOSTRAS de água	Nº AMOSTRAS de areia
1	1/12/97	TORRE	20	-	-
2	8/12/97	STº AMARO	12	-	-
3	4/01/98	STº AMARO	15	-	-
4	15/01/98	STº AMARO	-	3	2
5	23/01/98	TORRE	18	-	-
6	16/02/98	TORRE	12	-	-
7	4/03/98	CARCAVELOS	8	1	-
8	7/03/98	CARCAVELOS	9	1	2
9	26/03/98	TORRE	14	-	-
10	17/04/98	STº AMARO	6	-	-
11	23/04/98	STº AMARO	20	-	-
12	19/05/98	CARCAVELOS	3	-	-
13	27/05/98	PAÇO de ARCOS	40	-	-
14	8/07/98	TORRE	6	-	-
15	8/07/98	STº AMARO	16	-	-
16	10/08/98	FONTE da TELHA	34	-	-
17	16/08/98	FONTE da TELHA	58	-	-
18	25/08/98	FONTE da TELHA	15	-	-
TOTAL			306	5	4

3.2.2. Pesquisa e identificação de *Salmonella*

Para a pesquisa e identificação de *Salmonella* spp., foi utilizado um método bacteriológico convencional. Todos os meios foram preparados em material esterilizado e de acordo com as instruções do laboratório fabricante.

3.2.2.1. Pré-enriquecimento

O pré-enriquecimento não selectivo das amostras foi sempre efectuado no próprio dia da amostragem. A cada saco, adicionaram-se 20 ml de água de peptona tamponada (APT) (Oxoid CM 509), procedendo-se em seguida à respectiva homogeneização em stomacher e colocando-se na estufa a 30°C durante 24 horas.

No caso das amostras de água, foi preparada APT com o dobro da concentração normal e adicionou-se um volume idêntico da amostra, colocando-se em seguida na estufa, da mesma forma que as amostras sólidas.

3.2.2.2. Enriquecimento

Foram utilizados dois meios de enriquecimento selectivo diferentes, ambos líquidos: Selenito-Cistina (SC) (Difco 0687-17-1) e Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid CM 669).

Os tubos contendo 10 ml de caldo Selenito-Cistina foram semeados com um mililitro do sobrenadante de cada pré-enriquecimento, sendo posteriormente colocados na estufa a 37°C, durante 24 horas.

Os tubos contendo o caldo de Rappaport-Vassiliadis foram semeados com duas gotas de sobrenadante de cada pré-enriquecimento, sendo por sua vez colocados na estufa a 42°C, durante 24 horas.

3.2.2.3. Isolamento

A partir dos enriquecimentos referidos no parágrafo anterior, efectuaram-se, para cada um deles, sementeiras em gelose por esgotamento em estria, em dois tipos de meios selectivos:

- “Brilliant Green Agar” (BGA) (Oxoid CM 263);
- “Hektoen Enteric Agar” (HE) (Oxoid CM 419).

As placas semeadas foram incubadas a 37°C por um período de 18 a 24h.

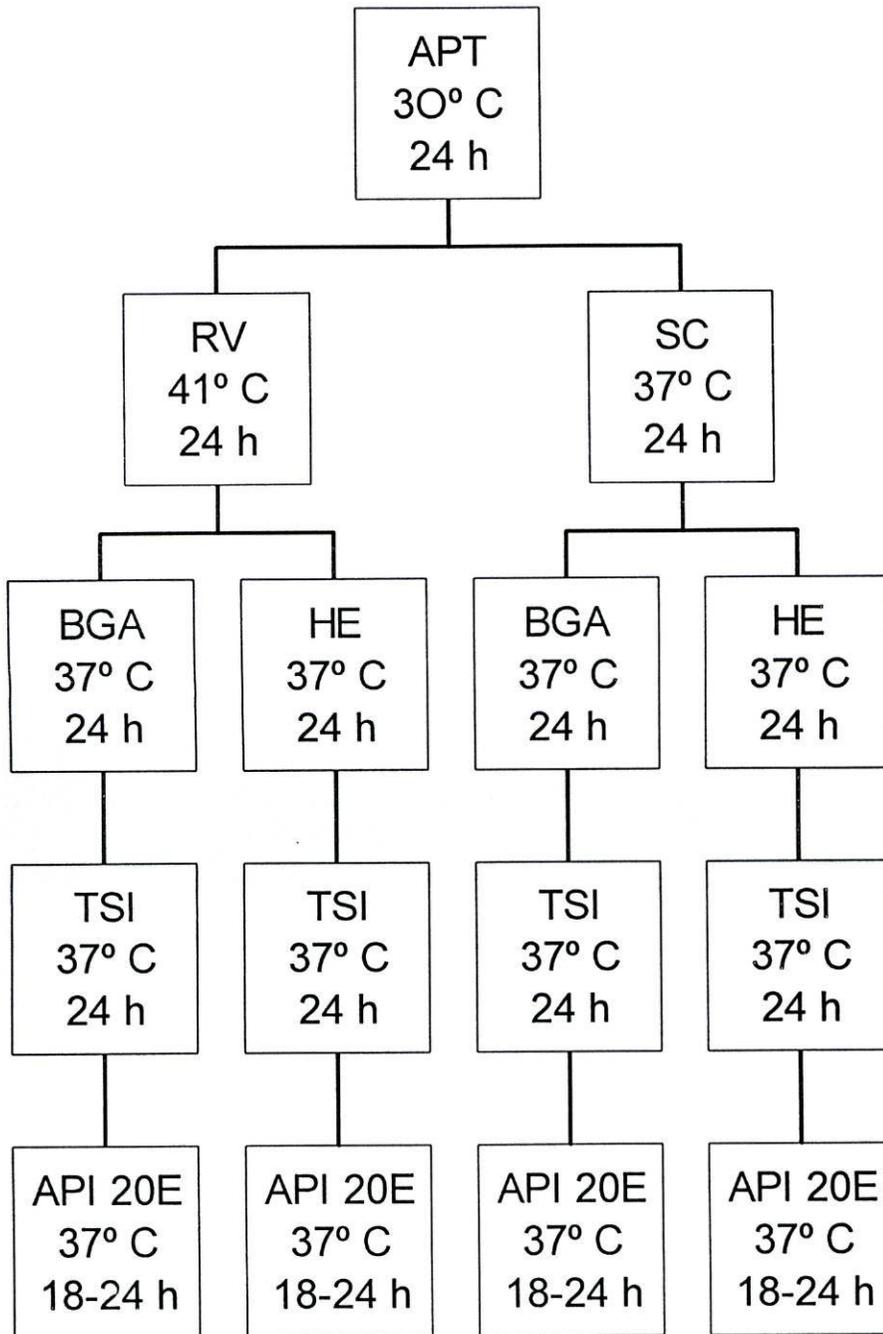
Quando não se observou crescimento às 24 horas, foi efectuado uma nova tentativa de isolamento a partir dos enriquecimentos de 48 horas que apresentavam turvação ou sinais de crescimento bacteriano.

Nas placas com crescimento, procedeu-se à marcação das colónias consideradas suspeitas. As características morfológicas típicas são as seguintes: colónias redondas e de contornos bem definidos, não ultrapassando os 2 ou 3 milímetros de diâmetro e de uma consistência quebradiça quando picadas pela ansa ou aro:

- No meio BGA, estas colónias apresentam-se cor de rosa translúcido devido à sua incapacidade de fermentar a lactose;
- No meio de Hektoen, as colónias apresentam-se azul-esverdeado translúcido, com o centro negro para os serotipos produtores de sulfureto de hidrogénio.

Os diferentes passos utilizados para o isolamento de *Salmonella* spp. encontram-se esquematizados na figura 3.2.2.1.

Figura 3.2.2.1-Esquema do protocolo de análise para a pesquisa de *Salmonella* spp.



3.2.2.4. Identificação

Para a identificação recorremos a métodos morfológicos, bioquímicos e serológicos.

Cada colónia marcada, num máximo de 5 por placa, foi semeada em tubos de gelose inclinada “Triple Sugar Iron agar” (TSI) (Oxoid CM 277), sendo incubados a 37°C, por um período de 18 a 24 horas.

Finda a incubação, as culturas foram seleccionadas pelas suas características morfológicas e pelo seu comportamento bioquímico típico, nomeadamente a capacidade de fermentação diferenciada dos glúcidos (glucose, lactose e sacarose), sendo consideradas com maior probabilidade de pertencerem ao género *Salmonella* as colónias lactose e sacarose negativas, com produção de gás e sulfureto de hidrogénio.

Avaliou-se para algumas culturas a capacidade de hidrólise da ureia, semeando-as em ureia agar (Oxoid CM 72) por um período de 8 horas, permitindo desta forma uma primeira triagem entre culturas ureia negativas (suspeitas de pertencerem ao género *Salmonella*) e ureia positivas. Esta prova revelou-se particularmente útil para a distinção de culturas de microrganismos pertencentes ao género *Proteus*, produtores de uma urease potente.

A identificação definitiva foi realizada com as provas do sistema API 20E para enterobacteriáceas Gram-negativas (Bio-Mérieux 20100).

Os isolados, biotipificados, foram confirmados serologicamente utilizando soros anti-*Salmonella* polivalentes (Difco 2264).

3.3.Resultados

3.3.1.Prevalência de *Salmonella* spp.

No total, obtiveram-se 99 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de 40 amostras positivas, correspondendo a uma prevalência de 12,7% (quadro 3.3.1.1.).

Todas as amostras de areia revelaram-se negativas. No caso das amostras de água, as 3 positivas foram colhidas na praia de Santo Amaro de Oeiras, revelando a presença de Salmonelas em apenas 50 ml, incluindo na água do mar (quadro 3.3.1.1.).

QUADRO 3.3.1.1.- Frequência de isolamentos de *Salmonella* spp. em fezes, areia e água.

NATUREZA DA AMOSTRA	nºtotal de amostras	POSITIVOS	FREQUÊNCIA RELATIVA
Fezes	306	37	12,1%
Água	5	3	60,0%
Areia	4	0	0,0%
TOTAL	315	40	12,7%

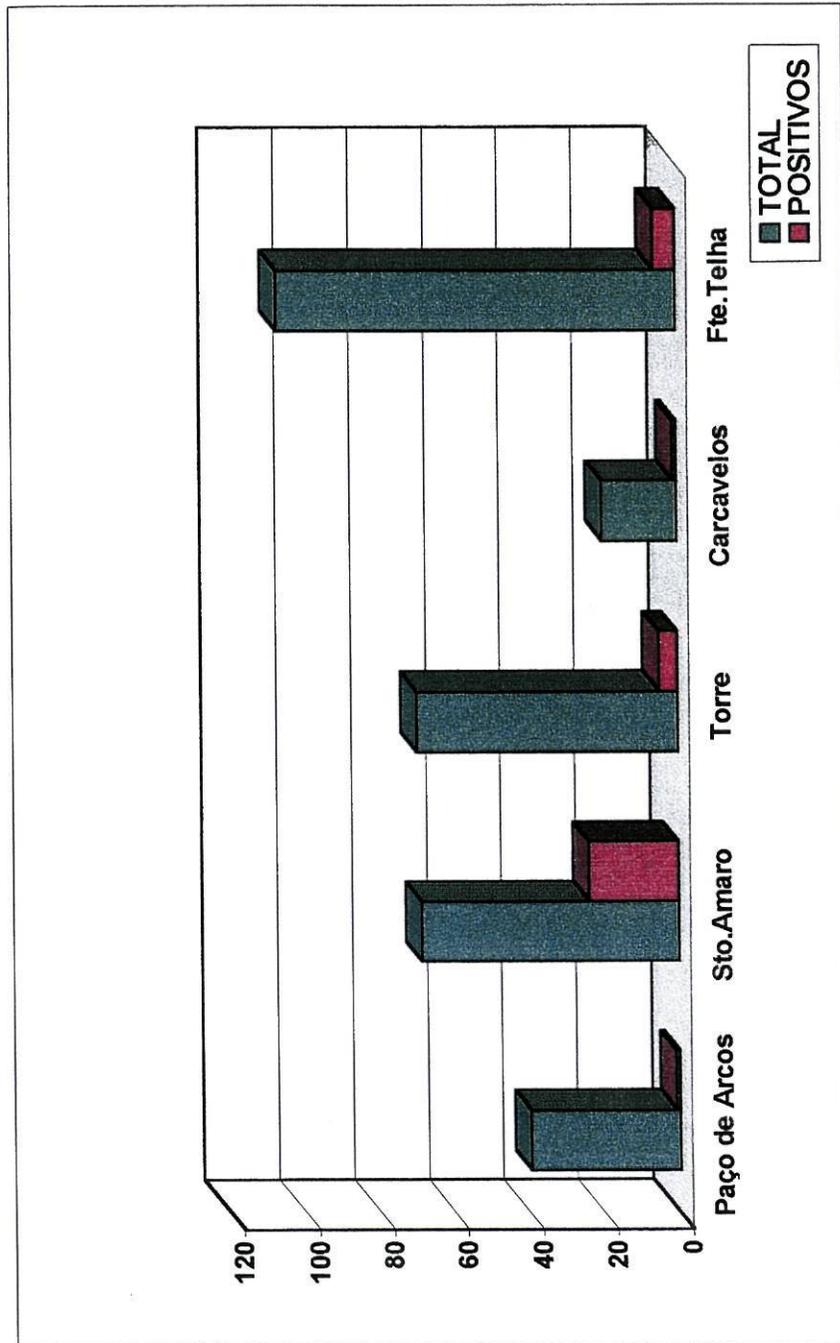
Para um total de 306 amostras de fezes, isolou-se pelo menos um serotipo de *Salmonella* spp. em 37 amostras, correspondendo a um índice de excreção fecal de 12,1%. No entanto, a frequência relativa foi extremamente variável de lote para lote (quadro 3.3.1.2.): em 6 lotes não se isolaram *Salmonella* spp., mas nos lotes positivos, a prevalência oscilou entre 2,5% e 60%.

QUADRO 3.3.1.2.- Prevalência de *Salmonella* spp. nas amostras de fezes por lote.

Nº de lote	Nº AMOSTRAS	AMOSTRAS POSITIVAS	%
1	20	0	0,0%
2	12	1	8,3%
3	15	3	20,0%
5	18	3	16,7%
6	12	0	0,0%
7	8	1	12,5%
8	9	0	0,0%
9	14	2	14,3%
10	6	3	50,0%
11	20	12	60,0%
12	3	0	0,0%
13	40	1	2,5%
14	6	0	0,0%
15	16	5	31,3%
16	34	0	0,0%
17	58	6	10,3%
18	15	0	0,0%
TOTAL	306	37	12,1%

As prevalências por local de amostragem também foram muito diferentes como se pode verificar no gráfico 3.3.1.1. e no quadro 3.3.1.3, variando entre 2,5% e 34,8% de amostras positivas por praia.

GRÁFICO 3.3.1.1.-Amostras positivas em relação ao número total de amostras por praia



QUADRO 3.3.1.3.-Frequência de amostras positivas em relação ao número total de amostras por praia

PRAIA	Nº amostras	POSITIVOS	%
Paço de Arcos	40	1	2,5%
Sto.Amaro	69	24	34,8%
Torre	70	5	7,1%
Carcavelos	20	1	5,0%
Fte.Telha	107	6	5,6%

3.3.2.Eficácia do protocolo de isolamento

Os isolados de *Salmonella* spp. foram obtidos a partir de diferentes combinações de meios de enriquecimento e de isolamento.

Verificou-se que a reproductibilidade do caldo RV foi de 100%, ou seja, todas as amostras positivas foram detectadas com este enriquecimento (quadro 3.3.2.1). A partir do caldo SC, apenas se obtiveram 7,9% do total das amostras positivas.

QUADRO 3.3.2.1- Eficácia dos caldos de enriquecimento no isolamento de *Salmonella* spp.

MEIO	Nº DE POSITIVOS	% EM RELAÇÃO AO TOTAL
Selenito-Cistina (SC)	3	7,9%
Rappaport-Vassiliadis (RV)	37	100,0%

Verificou-se que a gelose de isolamento HE teve uma reproductibilidade de 94,7% (quadro 3.3.2.2.), ligeiramente superior ao BGA (89,5%).

QUADRO 3.3.2.2.- Eficácia das geloses selectivas no isolamento de *Salmonella* spp.

MEIO	Nº DE POSITIVOS	% EM RELAÇÃO AO TOTAL
Brilliant Green Agar (BGA)	34	89,5%
Hektoen Enteric Agar (HE)	36	94,7%

3.4. Discussão

3.4.1. Discussão das prevalências de *Salmonella* spp.- Considerações epidemiológicas

A prevalência de *Salmonella* em fezes encontrada neste estudo foi de 12,1%. No entanto, observaram-se grandes diferenças na taxa de positividade entre os diferentes lotes, variando de 0 a 60%. As diferentes referências, apontadas na literatura, também indicam que estes valores podem ser extremamente variáveis.

Contudo, nenhum dos trabalhos anteriores foi realizado no nosso país. Mesmo estando envolvidas as mesmas espécies de aves, com hábitos alimentares semelhantes, não parece existir qualquer padrão de prevalências, talvez em resposta à multiplicidade de factores que interferem na infecção destas aves por *Salmonella* spp. A comparação da panóplia de valores encontrados na literatura a este respeito, e comparada pelos próprios autores nas suas revisões bibliográficas, parece impor cautela quanto à sua interpretação: Existem, certamente, valores diferentes nas incidências nos humanos e animais das áreas geográficas estudadas e que poderão estar inevitavelmente correlacionadas com as encontradas nos Larídeos.

Porém, sobressai alguma uniformidade quando se tratam de rastreios acerca das prevalências de salmoneloses em várias espécies de aves silvestres: a prevalência é quase invariavelmente superior nos Larídeos relativamente às outras espécies (Kapperud e Rosef, 1983; Hubálek *et al.*, 1995; Cízek *et al.*, 1995; Palmgren *et al.*, 1997).

Para a comparação mais clara, os diferentes trabalhos relativos ao papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp., encontram-se, de forma resumida e por ordem cronológica, apontados no quadro 3.4.1.1. Refere-se nalguns casos, e por se julgar de interesse para a discussão, o enquadramento dos resultados em pesquisas mais vastas, nomeadamente a pesquisa de outros microrganismos patogénicos para o Homem, bem como o envolvimento de outras espécies de aves.

QUADRO 3.4.1.1.- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (1)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP. (2)	CORRELAÇÃO
Williams <i>et al.</i>	1976	GB	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Entre 5% (área não urbana) e 30,9% (área urbana)	S. Typhimurium S. Bredny S. Hadar	Prevalência no gado da mesma área
Williams <i>et al.</i>	1977	GB	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	-----	S. Livingstone (único estudado)	Transmissão deste serotipo particular ao gado bovino
Gould <i>et al.</i>	1978	GB	5 espécies do género <i>Larus</i>	<i>Salmonella</i> spp. <i>Clostridium perfringens</i> coliformes totais, coliformes fecais, estreptococcus fecais	0% (17 amostras de animais com alimentação controlada)	-----	Diminuição da qualidade da água (nº bactérias indicadoras e quantidade de nutrientes)
Johnston <i>et al.</i>	1979	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i> <i>L. marinus</i> <i>L. ridibundus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	(não calculada)	S. Muenchen S. Panama	Gado leiteiro (através da contaminação da água de bebida) e transmissão a humanos através do leite

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serótipos de maior frequência

QUADRO 3.4.1.1- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (1)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP. (2)	CORRELAÇÃO
Williams <i>et al.</i>	1976	GB	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Entre 5% (área não urbana) e 30,9% (área urbana)	S. Typhimurium S. Bredny S. Hadar	Prevalência no gado da mesma área
Williams <i>et al.</i>	1977	GB	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	-----	S. Linvingstone (único estudado)	Transmissão deste serotipo particular ao gado bovino
Gould <i>et al.</i>	1978	GB	5 espécies do género <i>Larus</i>	<i>Salmonella</i> spp. <i>Clostridium perfringens</i> coliformes totais, coliformes fecais, estreptococcus fecais	0% (17 amostras de animais com alimentação controlada)	-----	Diminuição da qualidade da água (nº bactérias indicadoras e quantidade de nutrientes)
Johnston <i>et al.</i>	1979	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i> <i>L. marinus</i> <i>L. ridibundus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	(não calculada)	S. Muenchen S. Panama	Gado leiteiro (através da contaminação da água de bebida) e transmissão a humanos através do leite

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serótipos de maior frequência

QUADRO 3.4.1.1- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (II)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP.(2)	CORRELAÇÃO
Fenlon	1981	Escócia (GB)	<i>Larus</i> spp. (não especificado)	<i>Salmonella</i> spp.	12,9% (1242 amostras) e 17-21% perto de descargas de esgoto	S. Agona S. Panama S. Typhimurium	Correlação com serotipos humanos e animais (após análise de serotipos em esgotos)
Benton et al.	1983	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i> <i>L. canus</i> <i>L. fuscus</i> <i>L. ridibundus</i>	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp. Estreptococos fecais (ÁGUAS) <i>Salmonella</i> spp. (GAIVOTAS)	17% (154 amostras)	S. Typhimurium S. Hadar	Contaminação de um reservatório de água (serotipos em comum e correlação entre nº de aves e coliformes na água)
Butterfield et al.	1983	Inglaterra (GB)	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	2,1% (1975-6) 8,4% (1979)	S. Heidelberg S. Typhimurium S. Hadar	-----
Coulson et al.	1983	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i> <i>L. fuscus</i> <i>L. ridibundus</i> <i>L. marinus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Entre 4,5% e 3,1% entre os quais 0 a 18,9% eram S. Montevideo	S. Montevideo (único estudado)	Picos de infecção em ovinos e bovinos quando maior presença destas aves

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serotipos de maior frequência

QUADRO 3.4.1.1- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (III)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP.(2)	CORRELAÇÃO
Fenlon	1983	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	55% (amostragem em aves exclusivamente numa estação de tratamento de esgotos)	S. Stanley S. Typhimurium	Determinação de serotipos comuns às aves e ao esgoto
Kapperud et al.	1983	Noruega	Várias espécies de Larídeos e outras aves silvestres e urbanas	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter fetus</i> <i>Yersinia</i> spp.	Entre 1,5% e 3,7% (dependendo do local de amostragem e idade dos animais)	S. Typhimurium S. Indiana S. Djugu	Maior prevalência em Larídeos do que nas outras espécies de aves
Fricker	1984	Escócia (GB)	<i>L. ridibundus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	17,7%	S. Takoradi S. Virchow	Comparação com serotipos nas águas residuais tratadas numa estação de tratamento de águas
Girdwood et al.	1985	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i> <i>L. fuscus</i> <i>L. ridibundus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	7,8%	S. Virchow S. Typhimurium	Correlação com densidade populacional e as variações sazonais de incidência nos humanos

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serotipos de maior frequência

QUADRO 3.4.1.1- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (IV)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP.(2)	CORRELAÇÃO
Monaghan <i>et al.</i>	1985	Escócia (GB)	<i>L. argentatus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	9,2% (época reprodutiva) 9,8% (época não reprodutiva)	<i>S. Virchow</i> <i>S. Typhimurium</i>	Correlação positiva com incidência em humanos, devendo reflectir uma contaminação do ambiente
Quessy <i>et al.</i>	1992	Canadá	<i>L. delawarensis</i>	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Listeria</i> spp.	8,7%	-----	Concluem as aves terem um papel menor na epizootologia destas bacterioses
Lévesque <i>et al.</i>	1993	Canadá	<i>L. delawarensis</i>	Coliformes fecais <i>Salmonella</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp.	(Não calculada) (3)	<i>S. Brandenburg</i> <i>S. Agona</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Stanley</i>	Correlação positiva entre nº de gaivotas na praia e coliformes fecais na água
Hubálek <i>et al.</i>	1995	Rép. Checa	<i>L. ridibundus</i> e outras aves silvestres	<i>Salmonella</i> spp.	25%	<i>S. Typhimurium</i>	-----

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serótipos de maior frequência.

(3)- Neste estudo a prevalência não foi calculada por indivíduo, mas por grama de fezes.

QUADRO 3.4.1.1- Papel dos Larídeos como portadores de *Salmonella* spp.- Estudos anteriores (V)

AUTOR(ES)	ANO	LOCAL	ESPÉCIES ESTUDADAS	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	% DE SALMONELLA SPP. (1)	SERÓTIPOS DE SALMONELLA SPP.(2)	CORRELAÇÃO
Cizek <i>et al.</i>	1995	Rép. Checa	Várias espécies de aves silvestres	<i>Salmonella</i> spp.	2,9% (<i>L. canus</i>) Entre 4,2% e 19,2% Consoante idade (<i>L. ridibundus</i>)	S. Typhimurium	Contaminação do ambiente
Palmgren <i>et al.</i>	1997	Suécia	<i>L. canus</i> <i>L. ridibundus</i>	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>E. coli</i> O157: H/	4%	S. Typhimurium	-----
Sixl <i>et al.</i>	1997	Rép. Checa	<i>L. ridibundus</i> (juvenis)	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Campylobacter</i> spp	51%	S. Typhimurium (único estudado)	Estudo das antibioresistências

Notas: (1)- Apenas estão indicadas as prevalências no caso dos Larídeos; (2)- Apenas estão indicados por ordem os serotipos de maior frequência

3.4.1.1. Riscos para Saúde Pública

3.4.1.1.1. Correlacionamento com prevalências em humanos e animais

A associação destas aves com surtos de salmoneloses em humanos e em animais de interesse pecuário tem sido avaliada por diversos autores (Williams *et al.*, 1976 e 1977; Johnston *et al.*, 1979 e 1981; Reilly *et al.*, 1981; Coulson *et al.*, 1983; Girdwood *et al.*, 1985; Monaghan *et al.*, 1985).

Williams *et al.* (1976 e 1977) incriminaram gaivotas na contaminação de pastagens de ruminantes, observando-se surtos de salmoneloses nos animais que as utilizavam.

Johnston *et al.* (1979) também teriam correlacionado estas aves na transmissão de *Salmonella* spp. através da contaminação de águas de abeberamento para o gado leiteiro.

Reilly *et al.* (1981) estudaram as fontes contaminantes em 26 episódios ressendiciados de salmoneloses humanas e do gado leiteiro na Escócia, incriminando os excrementos de gaivotas em três surtos no gado.

Mais tarde, Coulson *et al.* (1983) compararam mapas de distribuição de *L. argentatus* na Escócia e mapas de distribuição dos surtos de *Salmonella* Montevideo em gado ovino e bovino, previamente determinados por Sharp *et al.* (1983, citados por estes autores), encontrando similitudes gritantes entre as duas distribuições. Embora os padrões fossem os mesmos, dando fortes evidências do envolvimento destas aves, as provas permaneceram circunstanciais, não havendo correlação directa causa / efeito.

Também os trabalhos de Girdwood *et al.* (1985) e Monaghan *et al.* (1985), encontraram uma relação entre épocas do ano de maior prevalência nos humanos com as prevalências nas gaivotas examinadas, não imputando no entanto, a estas aves, o papel de transmissor.

Uma relatório anónimo da O.M.S. de 1979, citado por Gledel (1984), afirma que a contaminação humana na cantina de um hospício foi correlacionada com a presença de gaivotas.

Quando certos marcadores epidemiológicos, nomeadamente quando serotipos pouco usuais estão envolvidos, a relação entre gaivotas e infecções humanas e animais pode ser estabelecida com maior precisão. Johnston *et al.* (1981) citam um caso peculiar

ocorrido na Escócia: Um Homem, proveniente da Malásia, foi hospitalizado, isolando-se *Salmonella* Zanzibar do mesmo, tendo regressado ao seu país de origem após a cura clínica. Decorridas algumas semanas, o mesmo serotipo foi isolado no leite e num vitelo provenientes de uma exploração onde eram frequentemente observadas gaivotas pousadas nas pastagens. Estas mesmas aves também eram avistadas perto das descargas de esgoto.

3.4.1.1.2. Correlacionamento com a degradação da qualidade das águas

Existem alguns trabalhos com o intuito de avaliar o papel das gaivotas na degradação da qualidade das águas, quer as de consumo para as populações humanas e animais, quer para as águas de recreio (Gould e Fletcher, 1978; Johnston *et al.*, 1979; Benton *et al.*, 1983; Lévesque *et al.*, 1993).

Gould e Fletcher (1978) correlacionaram a quantidade de matéria fecal depositada, por diversas espécies de gaivotas, num reservatório de água Inglês, com um aumento significativo dos indicadores de contaminação fecal, nomeadamente os coliformes.

Benton *et al.* (1983), implicaram gaivotas como as principais responsáveis pela diminuição da qualidade microbiológica de um reservatório de água perto de Glasgow, mais precisamente, testemunharam uma acentuada degradação no Inverno, época onde estas aves se encontram em maior número no reservatório em questão.

Lévesque *et al.* (1993), provaram a interdependência entre o número de gaivotas (*L. delawarensis*) nas praias e contagens de coliformes totais, concluindo que estas aves podem contribuir para a degradação das águas de recreio. A correlação não foi efectuada directamente entre as aves e a presença de *Salmonella* spp. nas águas. No entanto, amostras de fezes recolhidas, em meio urbano, de animais pertencentes à mesma colónia que frequentava a praia, revelou a presença de salmonelas.

A reciprocidade entre a presença deste tipo de aves e a degradação da qualidade das águas não é surpreendente: representa o aumento dos índices de contaminação bacteriana como corolário obrigatório do aumento da matéria orgânica de origem fecal, independentemente da sua origem.

Quando se requer uma correcta desinfecção de águas, equipamentos ou instalações, é conhecido que muitos dos agentes utilizados actuam dificilmente na

presença de matéria orgânica. O material fecal, incluindo o proveniente das gaivotas, pode contribuir para dificultar grandemente a actuação destes agentes.

As investigações de Benton *et al.* (1983) demonstraram a presença de *E. coli* em amostras de água que continham até 0,2 mg/ l de cloro livre, referindo o papel protector da matéria fecal das gaivotas, como impedimento à correcta desinfecção. Estes autores concluíram mesmo que, a água do reservatório Escocês estudado era de excelente qualidade, quase não necessitando de cloração se as gaivotas tivessem o acesso negado, o que estes investigadores conseguiram através de um sistema bio-acústico, imitando sons de aviso e alarme das próprias gaivotas.

Gould e Fletcher (1978) afirmam que a contaminação das águas é particularmente prejudicial nos reservatórios onde a diluição é limitada ou quando existe ausência de luz solar, um factor importante de mortalidade, nomeadamente no grupo dos coliformes.

A grande quantidade de matéria fecal também pode aumentar significativamente a concentração de nutrientes nas águas, embora este problema seja considerado de menor gravidade que a carga bacteriana (Gould e Fletcher, 1978).

As escassas amostras de água que foram efectuadas no presente estudo, foram positivas na praia de Santo Amaro de Oeiras, sendo também a praia onde foram encontradas maior número de amostras positivas nas gaivotas. As amostras de água foram positivas para *Salmonella* spp. em apenas 50 ml, incluindo na água do mar. Parece pouco provável que a fonte de contaminação neste caso poderá ter sido as gaivotas, pois deveria ser necessário uma grande quantidade de material fecal contaminado para resultar em valores tão elevados. A contaminação dos banhistas por ingestão de água do mar encontra-se ainda mal avaliada mas é em geral considerada pouco relevante visto haver uma grande capacidade de diluição da água do mar e de os banhistas ingerirem, em média, 10 a 50 ml de água (Falcão citada por Araújo, 1997) ou no máximo 100 ml (Lévesque *et al.*, 1993). No entanto, perante os resultados apurados nas análises das águas, este risco parece não ser negligenciável.

3.4.1.2. Estado de portador assintomático

É conhecido que, em muitos animais, incluindo no Homem, após uma infecção quer assintomática, quer com evidência clínica, é frequente dar lugar a um estado de portador, por vezes com excreções intermitentes do agente etiológico. Este facto torna problemática a diferenciação entre:

- Indivíduos sãos, que nunca contactaram com o agente;
- Indivíduos sãos mas portadores e excretores em determinadas situações (“stress”, metais pesados, acumulação com outros agentes infecciosos, nomeadamente carga parasitária, entre outros);
- Indivíduos clinicamente doentes e excretores.

As gaivotas não parecem constituir uma excepção, tornando-se importante em termos epidemiológicos, esclarecer se existem portadores assintomáticos. O possível carácter intermitente destas excreções, bem como o desconhecimento dos factores que as precipitam, revestem de maior complexidade a avaliação dos riscos de transmissão.

Quando se efectua rastreios acerca das principais causas de morte nas aves silvestres, raramente as infecções salmonélicas são apontadas como a causa principal. Keymer (1958), num estudo quase exaustivo em cadáveres de aves, cobrindo inúmeras espécies silvestres das ilhas Britânicas, incluindo gaivotas, e variadíssimas etiologias, desde de causas infecciosas, a tóxicas, entre muitas outras, praticamente não isolou *Salmonella* spp. A única ave deste estudo de onde se isolou *Salmonella* Typhimurium em diversos órgãos, foi um cadáver de pato que apresentava sinais de debilitação extrema por várias infecções concomitantes, nomeadamente, uma enorme carga parasitária (céstodes e tremátodes).

Jauniaux *et al.* (1996), num estudo que visava esclarecer as causas da mortalidade de aves marinhas na Bélgica, calcularam a prevalência de *Salmonella* spp. em cadáveres destas mesmas aves, revelando valores extremamente baixos, não sendo por este motivo associados a uma causa frequente de mortalidade.

No nosso país, desde de 1982 que a distribuição e a mortalidade das aves marinhas no inverno é monitorizada. Granadeiro *et al.* (1997), percorreram, durante 6 anos (1990-

1996) o equivalente a 5330 km de costa portuguesa, registando 2660 cadáveres de aves marinhas, entre os quais 1017 eram Larídeos. Do conjunto das diferentes espécies de gaivotas monitorizadas (7 do género *Larus* e *Rissa tridactyla*), estas não foram as aves com maior taxa de mortalidade. Embora não tenham sido efectuados estudos necrópsicos nem microbiológicos, não houve evidência de mortes devido a causas infecciosas.

A maior parte dos autores que estudaram especificamente os Larídeos como veículos de agentes patogénicos para o Homem, também afirmam que a maioria destas aves são portadores assintomáticos de salmonelas. Com efeito, quando o estado de saúde das aves é mencionado nestes trabalhos, a maioria dos autores é unânime em afirmar que não existiam indícios de qualquer tipo de debilitação.

Coulson *et al.* (1983), analisaram zaragatoas cloacais de 5164 Larídeos, a maioria pertencente a espécie *Larus argentatus*, mas também *L. fuscus*, *L. ridibundus* e *L. marinus*, entre 1975 e 1982, capturando parte das aves em redes e também analisando cadáveres durante campanhas de abate para redução da população. Estes autores, que manusearam tanto aves em vida como cadáveres, afirmam não terem encontrado espécimens com evidências clínicas de salmoneloses.

Também Kapperud e Rosef (1983), num estudo que tinha por objectivo determinar os reservatórios silvestres de *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp. e *Salmonella* spp., afirmam que todas as aves que capturaram, para serem sujeitas a amostragem, aparentavam estar saudáveis, embora reconheçam que o método de captura utilizado favorecia a selecção das aves mais activas e consequentemente mais saudáveis. Os mesmos autores, referem que mesmo as aves que revelaram após as análises serem portadoras de salmonelas, não apresentavam qualquer sinal ou sintoma que as diferenciasse das restantes.

No estudo de Fenlon (1981), em que é dada relevância à quantidade de microrganismos excretados por *Larus* spp., é sugerido que, devido ao baixo número de *Salmonella* spp. por grama de fezes, estas aves poderão possuir a capacidade de transportar material infectado sem se infectarem elas próprias. Barnes (1979), já teria provado que pintos de galináceos podem albergar até 10^8 *S. Typhimurium* por grama de

conteúdo cecal sem apresentarem qualquer tipo de sintomatologia, e as gaiivotas das investigações de Fenlon (1981) encontram-se longe destes valores.

Para corroborar estas afirmações, existem numerosos estudos com o intuito de esclarecer o papel da flora intestinal de aves saudáveis na protecção da colonização por *Salmonella* spp., com especial relevância para as espécies de aves comestíveis, em que as infecções salmonélicas podem causar prejuízos avultados. Já Barnes *et al.* (1980), colocou a hipótese da flora do conteúdo cecal ter este papel protector. Mais recentemente, são inúmeras as referências acerca da exclusão competitiva de germes patogénicos nas aves, prevendo a possibilidade de reduzir o uso de antibióticos, quer para reduzir os níveis de resíduos nas carnes e ovos, quer para diminuir o aparecimento de estirpes resistentes à sua acção (Nisbet *et al.*, 1996; Hoszowski e Truszczynski, 1997; Humbert *et al.*, 1997). Será possível colocar a hipótese de, em aves silvestres, os mecanismos inerentes a uma ecologia microbiana intestinal complexa, resultarem do mesmo modo na protecção da infecção salmonélica.

Monaghan *et al.* (1985), num estudo que envolveu o rasteio de *Salmonella* spp. em gaiivotas vivas e em cadáveres, também não encontraram perdas na condição corporal de gaiivotas portadoras de salmonelas. Nos cadáveres examinados, não houve qualquer tipo de evidência que as aves portadoras teriam taxas de mortalidade superiores às outras aves.

Porém, verifica-se, com algumas excepções, que na maior parte dos trabalhos, a apreciação do estado de saúde das aves investigadas é subjectiva, baseando-se em avaliações de condições corporais, comportamento, mobilidade e outros critérios muito pouco exactos. Nas aves, é conhecido que o quadro nosológico de diferentes infecções pode ser muito pouco específico, sendo difícil aferir a etiologia sem recorrer a um exame necrótico cuidado, procurando algumas lesões patognomónicas, com a respectiva confirmação microbiológica posterior.

Hubálek *et al.* (1995) realizaram um estudo microbiológico em 6 juvenis de *L. ridibundus* moribundos (entre os 9 e 25 dias de idade). *S. Typhimurium* foi isolada do conteúdo intestinal de 3 aves com sinais de gastroenterite e de uma ave com gastroenterite e pneumonia. Este último animal apresentava uma pneumonia micótica, revelando tratar-se de uma infecção mista por *S. Typhimurium* e *Aspergillus fumigatus*.

Das várias referências estudadas, parece que a maior parte das infecções por *Salmonella* spp. nestas aves não conduz a quadros sintomatológicos graves, nem a aumentos significativos das taxas de mortalidade. No entanto, estas conclusões devem ser ponderadas com precaução, pois existem aves cujo exame anatomopatológico revelou lesões nas aves infectadas, bem como por se encontrar mal avaliado o sinergismo entre infecções salmonélicas e outros tipos de agentes debilitantes (vírus, parasitas, resíduos tóxicos).

Nas aves, é reconhecido que muitos metais pesados, como o chumbo, podem ser causadores de debilitação por interferir directamente em reacções metabólicas essenciais de algumas células da imunidade (Knowles e Donaldson, 1997). No estuário do Tejo, área geográfica onde incidiram as amostragens deste estudo, a presença de metais pesados constituiu ainda uma problema importante de poluição, encontrando-se mal avaliado o impacto sobre as aves aquáticas e a sua propensão a contraírem infecções oportunistas.

No presente estudo, e nos dias em que foram feitas as amostragens, não se encontrou nenhum cadáver de gaivota nas praias estudadas. Embora não tenha sido possível diferenciar animais portadores dos restantes, todos os animais aparentavam condição corporal, comportamento e mobilidade normal, reconhecendo, no entanto que esta apreciação é também de todo subjectiva, visto não ser ter efectuado qualquer tipo de exame, além da análise das fezes.

3.4.1.3. Transporte, propagação e disseminação de salmonelas

Averiguar a mobilidade entre área onde os agentes são transmitidos para estas aves e área onde poderão ser excretados revela-se da maior importância para avaliar os riscos de disseminação. A dispersão das populações de Larídeos ocorre sempre a dois níveis: o afastamento e regresso à colónia reprodutiva, no Outono e na Primavera, e as deslocações diárias, de e para os locais de alimentação.

No caso dos movimentos diários entre áreas de repouso e áreas de alimentação, as distâncias percorridas podem ser da ordem das dezenas de quilómetros.

Gould e Fletcher (1978) citam Hollam (1944), que verificou, numa população de gaivotas, uma dispersão de cerca de 50 km da zona de repouso para procurarem alimento.

Benton (1983), ao estudar o impacto de uma população de Larídeos na qualidade microbiológica de um reservatório de água na Escócia, encontrou as mesmas aves do reservatório, em duas lixeiras a céu aberto situadas a 5 km do mesmo.

Também Coulson *et al.* (1983) revelaram uma especial preocupação relativamente à mobilidade e à área de cobertura potencial destas aves. Com efeito, e numa tentativa de elucidar o envolvimento de Larídeos na transmissão de *Salmonella* Montevideo ao gado Escocês, observaram gaivotas tanto nas pastagens situadas perto da costa como nas que se encontravam longe dela, concluindo que mesmo o afastamento da orla marítima não seria suficiente para evitar uma eventual contaminação das pastagens.

Relativamente às deslocações em maior escala, e como se referiu no capítulo referente à ecologia e biologia dos Larídeos, estas aves são capazes de percorrerem largas distâncias entre colónias reprodutivas e área invernante.

Coulson *et al.* (1983) afirmam que a maior parte dos espécimens de *L. argentatus* regressam à colónia reprodutora efectuando um único voo, podendo transportar salmonelas no seu intestino de uma só vez a centenas de quilómetros.

Monaghan *et al.* (1985) tentaram relacionar Larídeos portadores de salmonelas com a ecologia alimentar, recorrendo para este efeito a inúmeros registos de observação de aves. Estes autores encontraram quer adultos, quer juvenis percorrendo mais de 250 km em menos de uma semana.

No presente estudo, a variabilidade do número de amostras por lote e as escolhas das praias para as colheitas, foi influenciada pela mobilidade das gaivotas. Com efeito, e para as praias da costa do Estoril, nem sempre as mesmas praias eram as mais ricas em bandos de aves, notando-se haver uma predisposição para existir um maior número de aves em praias onde:

- Existiam menos pessoas e menos animais a perturbarem-nas (por exemplo cães passeados pelos respectivos donos);
- Existia maior insolação;
- Existia maior alimento facilmente disponível (contentores de lixo destapados por exemplo);
- A água e a ondulação eram mais calmas, sendo os locais onde desembocam efluentes de água doce particularmente atractivos.

Algumas destas condições podiam variar durante a manhã, notando-se movimentos de algumas aves entre algumas praias adjacentes, indicando que, algumas amostragens em praias diferentes poderão eventualmente corresponder aos mesmos indivíduos.

Relativamente aos movimentos em maior escala, sabe-se que a espécie de Larídeo preponderante no estuário de Tejo é *Larus fuscus* sendo a maior parte dos indivíduos invernante no nosso país, reproduzindo-se, uma pequena proporção nas Berlengas. As salmonelas albergadas pelas aves do presente estudo poderão ser transportadas a distâncias consideráveis, quer entre regiões do nosso país, quer para países do Norte da Europa.

3.4.1.4. Carga bacteriana e tempo de excreção

Não menos importante do que as infecções poderem ser inaparentes e a sua disseminação e estreitamente correlacionados com estas características, encontram-se o tempo de excreção dos agentes e a sua quantidade.

No presente trabalho, não foi possível manter aves em laboratório ou marcá-las *in situ* para determinar o tempo de excreção. Também não foi possível avaliar a quantidade de microrganismos por amostra visto o isolamento de *Salmonella* spp. ter sido efectuado recorrendo enriquecimentos.

Girdwood *et al.* (1985) determinaram o tempo de excreção de salmonelas por parte de 17 gaivotas portadoras de um total de 84 aves confinadas em laboratório, encontrando uma duração máxima de excreção de 4 dias (2 animais) sendo a moda 3 dias (8 animais). No entanto, o tempo de excreção nas aves no seu habitat natural permanece desconhecido.

O trabalho de Fricker (1984), que comparou serotipos de *Salmonella* spp. presentes em águas residuais e em gaivotas, parece confirmar estes valores: quando um determinado serotipo foi isolado das águas, este era isolado nas fezes de exemplares de *Larus ridibundus* cerca de 4 dias depois, prolongando-se a excreção nas fezes por um período de 5 dias após o seu desaparecimento nas análises de água.

Mesmo se o tempo de excreção é relativamente elevado, permitindo que exista um transporte de microrganismos a longas distâncias, só poderá ser relevante se esta carga transportada é suficientemente grande para constituir uma dose infestante para outros animais susceptíveis, incluindo o Homem. A determinação do número de salmonelas excretado por grama de fezes é extremamente complexa: existem numerosos factores, bióticos e abióticos, que contribuem para a diminuição do número de microrganismos viáveis. Alguns autores tentaram, no entanto, esclarecer se a carga bacteriana encontrada em aves portadoras de *salmonella* spp. constituíam um risco de contaminação, tendo encontrado quase sempre valores baixos (Fenlon, 1981; Coulson *et al.*, 1983; Girdwood *et al.*, 1985; Lévesque *et al.*, 1993).

Fenlon (1981) determinou a quantidade de salmonelas excretadas através da técnica NMP (número mais provável) de 5 tubos, encontrando de 0,18 a 191 salmonelas por grama de fezes, sendo a média 39,7 e o desvio padrão de 52,7. O mesmo autor afirma

ter encontrado aproximadamente a mesma concentração nas análises efectuadas nas descargas de esgoto onde eram avistadas as gaivotas. Com base nestes valores, este trabalho questiona a validade de investigações anteriores, como os trabalhos de Williams *et al.* (1977) e Johnston *et al.* (1979) que implicavam estas aves na transmissão de salmoneloses ao gado leiteiro, afirmando mesmo que o gado em questão deveria possuir deficiências imunitárias devidas ao “stress” de uma produção intensificada, favorecendo a infecção salmonélica.

Também Spence e Westwood (1978), que relacionaram a infecção por *Salmonella* Agona em gado ovino através de água contaminada por excrementos de aves, afirmam que, muito provavelmente, os animais que contraíram a infecção se encontravam debilitados.

Lévesque *et al.* (1993), utilizando a mesma metodologia seguida por Fenlon (1981), determinaram a concentração de salmonelas por grama de fezes de *L. delawarensis*, chegando a valores superiores, entre $1,5 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^4$ células por grama de fezes. Utilizando o rácio *Salmonella* spp./ coliformes fecais nas fezes de gaivotas, estes autores determinaram o número provável de salmonelas nas águas devido a estas aves. Atendendo a que um banhista ingere entre 10 ml e 100 ml de água, apuraram que o número de bactérias ingeridas seria inferior a três, um valor muito pouco significativo, em termos de dose mínima infectante.

Coulson *et al.* (1983) e Butterfield *et al.* (1983) afirmam não ser a carga bacteriana por indivíduo o mais importante para uma transmissão potencial: O hábito das gaivotas se alimentarem em grupo e repousarem em bandos constituídos por um número elevado de indivíduos, pode aumentar significativamente a quantidade efectiva de microrganismos depositados no solo, multiplicando os riscos de contaminação para outros animais e para o Homem.

Fenlon (1981), já teria, unicamente em base nas fracas contagens de *salmonella* spp. que efectuou, debelado este argumento. Com efeito, à luz dos valores apontados, 500 gaivotas depositando aproximadamente 5 gramas de material fecal com 200 microrganismos viáveis por grama (5×10^5 no total) não seriam suficientes para contaminar outros animais.

Também Monaghan *et al.* (1985) não julgam ser muito plausível um risco elevado de infecção directa devido às fracas cargas bacterianas. Porém a percentagem de indivíduos portadores pode aumentar rapidamente de forma exponencial devido ao aumento da utilização de fontes contaminadas.

A fraca carga bacteriana encontrada em alguns trabalhos, contrasta com as investigações de outros autores (Williams *et al.*, 1976 e 1977; Johnston *et al.*, 1979; Coulson *et al.*, 1983) que implicaram as fezes de gaivotas como veículos de infecção salmonélica para o gado leiteiro, mesmo se algumas correlações são meramente circunstanciais: a observação de aves nas proximidades de bovinos ou ovinos infectados ou semelhanças intrigantes entre distribuição de alguns serotipos e a distribuição das aves. Estas incoerências questionam, quer a validade das contagens de microrganismos efectuados, quer a integração de todos os factores favorecedores da infecção salmonélica para o gado.

3.4.1.5. Prevalências segundo a espécie

As gaivotas são consideradas aves com grande mobilidade entre variadíssimas fontes alimentares, desde peixe e invertebrados encontrados ao longo da costa, descargas de esgotos, lixeiras e outras que estejam prontamente disponíveis. Muitas das diferenças nas prevalências encontradas nestas aves, resultam de adaptações a diferentes comportamentos alimentares, sendo extremamente difícil estabelecer qualquer tipo de padrão relativamente às espécies mais frequentemente envolvidas. Este comportamento alimentar varia grandemente conforme as fontes disponíveis que diferem, por sua vez, com as áreas estudadas.

Kapperud e Rosef (1983), afirma que *L. canus* é menos frequentemente avistada a alimentar-se em lixeiras. Porém também possui o hábito de se encontrar perto de descargas de esgoto, o que não salvaguarda esta espécie de uma eventual contaminação por esta via.

Também parece existir uma maior variedade de fontes alimentares nas espécies que têm maior capacidade de se deslocar para o interior costeiro como *L. ridibundus*: Palmgren *et al.* (1997) encontraram apenas salmonelas em amostras desta espécie e não

nas amostras provenientes de *L. canus*, a outra espécie de Larídeo estudada. As amostras provenientes de exemplares de *L. canus* eram em menor quantidade, podendo ser este facto suficiente para apenas serem encontradas amostras positivas nos exemplares de *L. ridibundus*.

Já Kapperud e Rosef (1983), isolaram, em áreas urbanas, *Salmonella* spp. nas amostras de fezes de *L. ridibundus* e não de *L. canus*, as duas espécies de Larídeos estudadas nestas áreas. Os mesmos autores encontraram amostras positivas em outras espécies de Larídeos em ambiente rural: *L. argentatus* e *L. marinus*.

Também Cízek *et al.* (1995) encontraram prevalências superiores para *L. ridibundus* do que para *L. canus*, afirmando que a primeira espécie não é tão exigente para a escolha dos locais de nidificação, sendo desta forma o reflexo de uma maior variabilidade alimentar e da contaminação ambiental dos locais frequentados.

Noutros estudos porém, como as investigações de Girdwood *et al.* (1985) a percentagem de aves portadoras é maior para *L. fuscus* e *L. argentatus*. O estudo foi efectuado em várias localidades escocesas, em que a competição entre diferentes espécies pelo alimento é grande e *L. fuscus* e *L. argentatus* são mais frequentemente avistadas perto de lixeiras do que *L. ridibundus*. Aliás, esta particularidade resultou na captura de mais de 40% dos exemplares, desta última espécie, apenas em campos abertos e pastagens para o trabalho em questão.

Do outro lado do Atlântico, *Larus delawarensis* também pode ser portadora de *Salmonella* spp.: Quessy *et al.* (1995) encontraram 8,71% de prevalência nesta espécie, em Monreal. Este valor enquadra-se perfeitamente nas prevalências encontradas nos estudos europeus.

Do conjunto de estudos em que são referidas prevalências de *Salmonella* spp. em diferentes espécies de Larídeos, não parece existir evidência que uma das espécies será tendencialmente maior portadora do que outra. As diferenças apontadas parecem decorrer de interacções ecológicas entre as espécies, delimitando habitats e fontes alimentares para cada uma delas segundo as diferentes localizações geográficas.

3.4.1.6. Prevalência segundo a idade, o sexo e a época de reprodução

Não foi possível, no presente estudo, proceder a sexagem dos animais de onde provieram as amostras, sendo igualmente difícil determinar, com exactidão, a idade dos animais. Devido às características bem diferenciadas da plumagem entre juvenis e adultos, constatou-se que a maior parte das amostras foi proveniente de aves adultas.

A maior parte dos trabalhos efectuados anteriormente e a que se teve acesso, são também escassos os que determinam o sexo e a idade dos animais testados.

Quando a idade das aves amostradas é referida, a maioria dos trabalhos apontam para prevalências superiores nos juvenis voadores.

Butterfield *et al.* (1983) encontraram prevalências de 9,7% em juvenis com idade inferior a um ano de idade contra 2% em aves de classes etárias superiores. Estes juvenis têm tendência a alimentar-se junto à costa, perto de descargas de esgoto relativamente às outras aves, correspondendo à fonte provável de contaminação neste estudo.

Porém, Kapperud e Rosef (1983) encontraram incidências de *Salmonella* spp. de 3,7% em adultos e 1,5% em juvenis, ou seja menos de metade do valor para as aves mais velhas. O estudo foi efectuado na zona de Oslo, verificando-se também, existir uma maior dispersão para os juvenis do que para as aves adultas. Neste caso particular, os juvenis deslocavam-se em maior número para a costa, mas esta encontrava-se livre de fontes contaminadas, enquanto os adultos frequentavam assiduamente uma lixeira de Oslo. Quando foi aplicado o método estatístico apropriado para aferir se existiam diferenças nos valores apurados para cada uma das classes etárias, estas não se revelaram estatisticamente significativas.

Monaghan *et al.* (1985), que examinaram fezes de 2985 espécimens de *Larus argentatus*, não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as percentagens de portadores das diferentes classes etárias.

Sixl *et al.* (1997), encontraram uma prevalência elevada (51%) de portadores de *Salmonella* Typhimurium, num estudo em que apenas foram amostrados juvenis de *L. ridibundus*.

A contaminação dos juvenis não voadores e dos ovos não parece ser importante. Girdwood *et al.* (1985) analisaram 134 ovos numa colónia reprodutora, não isolando *Salmonella* spp. em nenhum. Adicionalmente, 72 ovos foram também incubados e o intestino dos pintos analisado, indicando também resultados negativos. Também Bernardo e Pereira (1998, não publicado) isolaram apenas *Salmonella* Haart de um ovo proveniente da colónia das Berlengas, de um total de 32 amostras. Existem desta forma evidências de não existir transmissão vertical, como afirmam Girdwood *et al.* (1985).

O conjunto dos resultados leva a concluir que a interpretação das prevalências consoante a idade deve ser feita com a maior precaução. Alguns estudos, como o de Lévesque *et al.* (1993), que admitem como pressuposto que os juvenis são portadores mais regulares com base em estudos anteriores, poderão eventualmente não corresponder a realidade para as áreas em questão, visto estas diferenças decorrerem directamente da ecologia alimentar, variando esta largamente com a localização geográfica.

Também as diferenças de prevalências encontradas em ambos os sexos e segundo a época do ano estão estreitamente correlacionadas com padrões de comportamento alimentar.

Monaghan *et al.* (1985) diferenciaram duas épocas diferentes de amostragem em *L. argentatus* que frequentavam lixeiras, correspondendo sensivelmente à época reprodutiva (de Abril a Maio) e não reprodutiva (de Outubro a Fevereiro). A prevalência encontrada foi de 9,2% na época reprodutiva e 9,8% no Inverno. Com base em observações de aves, estes autores demonstraram que a probabilidade destas aves frequentarem as lixeiras mais do que uma vez por semana era maior na época não reprodutiva. Também 77% das aves observadas no Inverno alimentavam-se em lixeiras, mostrando que estas constituem uma fonte importante de alimento durante esta época do ano.

Relativamente a diferenças de prevalência entre os dois sexos, os mesmos investigadores não encontraram diferenças significativas na época reprodutora. No entanto, as fêmeas revelaram maior incidência de *Salmonella* spp. no Inverno do que os machos. Os machos que fizeram parte da amostragem deste estudo, revelaram

prevalências muito uniformes ao longo de todo o ano, enquanto as fêmeas portadoras representavam 22% na época não reprodutiva e 7% na época reprodutiva. Alguns factores foram apontados para a explicação destas diferenças:

- O ratio entre fêmeas e machos que frequentam lixeiras é maior no Inverno, enquanto na Primavera e no Verão o número de indivíduos de um e do outro sexo era muito semelhante;
- Os machos têm maior capacidade de seguir barcos de pesca (cerca de três vezes superior), tendo a possibilidade de ingerir, desta forma, alimentos não contaminados;
- Os machos possuem a tendência a impor-se pelo melhor alimento, não constituindo as fontes menos nobres uma excepção a esta regra: mesmo nas próprias lixeiras este fenómeno é observado, resultando no aproveitamento de áreas secundárias pelas fêmeas, com maior ingestão de alimentos em decomposição (Monaghan, 1980).

3.4.1.7. Correlação com a localização das amostragens e proximidade de fontes alimentares contaminadas

Como foi anteriormente referido, as diferentes espécies de Larídeos, com algumas diferenças pontuais, não parecem apresentar grandes diferenças em relação à possibilidade de adoptar fontes alimentares contaminadas, sendo a tendência a frequentar zonas com elevado risco praticamente idêntica para todas as espécies.

3.4.1.7.1. Estudos anteriores

Nos estudos anteriores, reconhece-se que, de uma maneira geral, a prevalência da contaminação por enteropatogénios das espécies aquáticas encontra-se estreitamente correlacionada com a salubridade ambiental, não constituindo os Larídeos estudados uma excepção a esta regra. Num estudo efectuado por Gould e Fletcher (1978), as amostras de

fezes de gaivotas foram recolhidas em aves confinadas em gaiolas e cuja dieta estava controlada, não tendo sido encontrada qualquer amostra positiva para *Salmonella* spp. indicando, desta forma, a fraca possibilidade deste tipo de bactéria poder fazer parte da flora intestinal residente normal.

Muitos trabalhos tentaram correlacionar a incidência de *Salmonella* spp. em gaivotas quer com a sua ecologia alimentar, quer com o grau de urbanização e densidade populacional das áreas de estudo.

No que diz respeito às possíveis fontes alimentares contaminadas, alguns autores tentaram relacionar as prevalências em gaivotas com a alimentação destas aves em lixeiras ou aterros sanitários (Monaghan *et al.*, 1985; Kapperud e Rosef, 1983) ou em descargas de esgoto (Fenlon, 1981 e 1983; Fricker, 1984).

Os trabalhos de Durrant e Beatson (1981) demonstraram a existência de salmonelas viáveis nos resíduos sólidos domésticos, nomeadamente na fracção correspondente a restos de carne de diferentes espécies animais, mesmo quando os lixos se encontravam perfeitamente confinados, impedindo qualquer tipo de contaminação por roedores, insectos ou aves. Estes autores reforçam a necessidade destes resíduos serem tratados de forma cuidada com o cobertura imediata do material depositado, impedindo, desta forma, que alguns animais tenham acesso a fontes contaminadas.

De todos os trabalhos publicados, as prevalências de *Salmonella* spp. são as mais elevadas nos estudos feitos em populações que se alimentavam em descargas de esgoto relativamente às que se alimentavam em lixeiras.

Os estudos de Fenlon de 1981 e de 1983, revelam bem como a proximidade de águas residuais e de esgotos pode influenciar a incidência de salmonelas nas gaivotas (12,9% de amostras positivas no geral contra 17 a 21% perto das descargas de esgoto em 1981 e 55% numa estação de tratamento de águas residuais), além de confirmar a presença de serotipos semelhantes.

Também Fricker (1984) encontrou em média uma prevalência de 17,7% em gaivotas (*Larus ridibundus*) que frequentavam uma estação de tratamento de águas residuais. Este autor também correlacionou positivamente a quantidade de *Salmonella* spp. presente nestas águas com a frequência de isolamento nas aves durante o mesmo período de tempo.

Parecem existir indícios de uma correlação directa entre a fonte de alimento e a sua carga bacteriana e a incidência de salmonelas nos Larídeos. No entanto, esta relação pode não ser uma constante e tem que ser interpretada com algum cuidado. Os trabalhos de Monaghan *et al.* (1985) constituem um exemplo marcante: demonstrou-se existir uma correlação proporcional entre as amostras provenientes de populações de *Larus argentatus* que se alimentavam em lixeiras com a excreção de salmonelas nas fezes, com maior ênfase no Inverno e para as fêmeas. No entanto, os mesmos investigadores também estudaram a prevalência noutra população presente numa ilha que servia de colónia reprodutora, e em que aparentemente não existia qualquer fonte contaminada nas proximidades, revelando uma prevalência superior de *Salmonella* spp. do que para o primeiro grupo de estudo.

3.4.1.7.2. Prevalências por praia- Comparação com a qualidade das águas

Um dos principais aspectos que decorre directamente da observação conjunta dos resultados do presente estudo com as análises feitas à qualidade das águas pelas autoridades competentes, é a prevalência mais elevada nas amostras que foram recolhidas nos concelhos de Oeiras, onde a qualidade da água e das praias é habitualmente mais deficiente. O lote que revelou maior número de lotes positivos nas fezes foi proveniente da praia de Santo Amaro no concelho de Oeiras. Também registou-se positividade para *Salmonella* spp. nas escassas amostras de águas recolhidas nesta praia.

Segundo os S.M.A.S. de Oeiras (citado por Anon, 1997b), em Agosto de 1997, pouco antes do início das colheitas para o presente trabalho, a qualidade da água desta praia, ultrapassava os valores máximos admissíveis para os coliformes totais e fecais, sendo consideradas praias com qualidade aceitável a boa, apenas as praias situadas a Oeste desta (Praia da Torre e praias do concelho de Cascais).

Na praia de Santo Amaro de Oeiras, parece ser a Ribeira da Laje a principal fonte de contaminação. De facto, as autoridades responsáveis pela vigilância da qualidade das águas balneares (A.R.S. de Lisboa) constatam, e mesmo após o funcionamento do novo sistema de saneamento da Costa do Estoril, que a qualidade das águas das ribeiras é ainda deficiente. Com efeito, verificou-se, perante a complacência das autarquias e alguma falta

de civismo de moradores, ligações directas de esgotos domésticos, feitas à margem da lei, às ribeiras ou aos colectores de águas pluviais (Anon., 1997a; Duarte, comunic. pessoal, 1999). Desta forma poderá constatar-se ainda deficiências em algumas praias no que respeita a aplicação da legislação comunitária, mesmo após a elaboração de um projecto muito oneroso (cerca de 35 milhões de contos) como o sistema de saneamento da Costa do Estoril.

Verificou-se também, nas pesquisas efectuadas, a peculiaridade da legislação não obrigar ao rastreio sistemático de salmonelas nas águas balneares: este é efectuado por rotina no início da época balnear, sendo repetido, nas restantes amostragens, apenas se a primeira análise se averiguou positiva.

De uma forma geral, registou-se em 1998 e 1999 uma melhoria global da qualidade das águas de recreio da Costa do Estoril (Duarte, comunic. Pessoal, 1999) devido ao funcionamento do sistema de saneamento e à correcta fiscalização de algumas ilegalidades acima mencionadas. Seria extremamente elucidativo, proceder a uma nova amostragem de fezes de Larídeos que frequentam estas praias, por forma a confirmar uma possível correlação entre a evolução dos diferentes parâmetros de poluição e a presença de microrganismos patogénicos nestas aves, contribuindo para confirmar o seu papel como indicadores de contaminação ambiental.

3.4.2. Discussão do protocolo de pesquisa de *Salmonella*

Existem numerosos meios de cultura que podem ser utilizados para pesquisa de *Salmonella*. O sucesso desta pesquisa, a partir de uma determinada amostra, depende de um grande número de variáveis intervenientes, desde da amostragem até à identificação.

O estudo dos diferentes meios para o isolamento de *Salmonella* spp. tem sido extremamente dinâmico, existindo inclusive, nos últimos vinte anos, o aparecimento de novos meios para o isolamento que recorrem a outras características que não a fermentação da lactose (como por exemplo o Rambach agar) ou a modificação de meios já existentes de forma a aumentar a sua eficácia (como as modificações introduzidas por Vassiliadis no caldo de Rappaport). No entanto, as tentativas de encontrar um protocolo de isolamento padrão têm sido envolvidas por alguma controvérsia, objectivadas também nas subtis diferenças de composição dos meios provenientes de laboratórios fabricantes diferentes.

Torna-se indispensável relembrar que muitos dos meios utilizados foram optimizados para a área da microbiologia alimentar e não para amostras ambientais.

A grande variação de prevalências de *Salmonella* spp. nos trabalhos anteriores é, quase invariavelmente, associada a diferenças na ecologia alimentar dos Larídeos conforme a área geográfica onde se encontram e as incidências de salmoneloses noutros intervenientes na epidemiologia desta infecção.

No entanto, a variabilidade devido à eficiência de diferentes protocolos de isolamento raramente é referida, podendo constituir eventualmente uma fonte não negligenciável de variação e tornando mais complexa a comparação dos resultados das diversas investigações.

3.4.2.1. Amostragem

No presente estudo, não se estabeleceu qualquer estratégia ou plano de amostragem, escolhendo os locais mais ricos em bandos no dia de cada recolha, não permitindo atribuir aos resultados uma representatividade em relação a população de Larídeos presente no estuário do Tejo.

A amostragem ocorreu recolhendo não apenas fezes, mas também um mínimo de areia e água.

Na maior parte dos trabalhos consultados, a recolha das amostras não foi efectuada da mesma forma, procedendo quer a zaragatoas cloacais, quer a lavagens cloacais, exceptuando os trabalhos de Gould e Fletcher (1978) e de Lévesque et al. (1993) em que a metodologia de recolha é semelhante à deste estudo, analisando as amostras após as aves terem defecado. Porém, estes investigadores confinaram as aves submetidas à experiência no laboratório ou estenderam capas de polietileno para a recolha sem contaminação, não ficando as amostras submetidas à flora da areia, nem à salinidade da água do mar. Embora as amostras do presente estudo tenham sido transportadas com a maior brevidade para o laboratório, desconhece-se o impacto que tiveram estes factores no apuramento dos resultados.

Optou-se pela colheita directa de material fecal, permitindo que a amostra fosse maior do que as recolhidas através de zaragatoas cloacais, sendo estas de execução mais laboriosa, e eventualmente resultando na recolha de pequenas quantidades matéria fecal em relação à fracção urinária. Também a apreciação visual no local, permitiu que fossem tomados por amostra o maior número possível de excrementos em que a proporção de fezes fosse maior em relação à porção urinária.

Gould e Fletcher (1978) foram os únicos investigadores que tentaram relacionar a natureza das amostras, classificadas de forma empírica pelo aspecto e cor, com a carga bacteriana. Não obstante a pesquisa de salmonelas tenha sido negativa, encontram-se, no trabalho referido, contagens superiores de *Clostridium* spp. e coliformes fecais nas amostras em que a porção acastanhada ou esverdeada era maioritária, correspondendo a material fecal.

A grande parte das investigações sobre a prevalência de salmonelas em Larídeos optou quer por se efectuarem zaragatoas cloacais, quer lavagens cloacais, por vezes capturando os animais em redes, permitindo que, independentemente do mesmo animal deixar vários depósitos fecais, este fosse amostrado uma única vez

Este tipo de metodologia foi particularmente útil nos trabalhos em que foram aferidas componentes epidemiológicas relevantes como a prevalência exacta por indivíduo, a espécie amostrada, o sexo e a idade do indivíduo.

Algumas investigações procederam à cultura de todo o intestino em aves abatidas, revelando resultados 15% a 20% superiores do que as zaragatoas cloacais (Girdwood *et al.*, 1985; Monaghan *et al.*, 1985). Este tipo de amostragem parece detectar, de forma mais exacta, as aves portadoras de *Salmonella*, mas não fornece a indicação da taxa de excreção se não combinado com uma amostragem das fezes, sendo este último valor de maior importância em termos epidemiológicos e sanitários. É de conhecimento geral que, muitos animais, incluindo o Homem, podem ser portadores e pouco excretores, como já foi anteriormente referido.

Também as lavagens cloacais parecem levar a um maior número de isolamentos relativamente às zaragatoas, concretamente 99% contra 77% dos resultados positivos, respectivamente, nos trabalhos de Girdwood *et al.* (1985)

3.4.2.2. Pré-enriquecimento

Todas as amostras, incluindo as amostras de água e de areia foram submetidas a um pré-enriquecimento em água de peptona tamponada (APT), sem qualquer tipo de substância selectiva, nem a uma temperatura que permitisse a inibição do desenvolvimento de outros microrganismos.

Encontra-se documentado, o prolongamento do tempo de sobrevivência das salmonelas no caso de fezes de animais (Mitscherlich e Marth, 1984b), desempenhando neste caso um papel protector, nomeadamente contra a dissecação. Porém, independentemente das recolhas de amostras terem sido feitas imediatamente após a defecação para a areia, alguns factores de “stress” podem ser inevitáveis: A presença num

hospedeiro diferente com excreções ácidas (gaivota), a flora competidora específica do hospedeiro e do meio onde foram depositadas (factores bióticos), e os factores físico-químicos decorrentes do meio ambiente marinho como a salinidade e a forte radiação ultra-violeta (factores abióticos).

O pré-enriquecimento não selectivo torna-se essencial para recuperar microrganismos, sobreviventes a factores adversos, que podem ter sido danificados de forma sub-letal, incapacitando a sua multiplicação se inoculados directamente em meios de enriquecimento com agentes seleccionadores, comprometendo seriamente o isolamento bem como a posterior serotipificação por perda do LPS.

O pré-enriquecimento pode ser efectuado num grande número de soluções, durante um período de 2 a 18 horas (Harvey e Price, 1979).

No caso de amostras provenientes do meio ambiente, em particular amostras de aquáticas, telúricas e fecais, já Thomason *et al.* (1977) provaram a utilidade do pré-enriquecimento com APT, resultando em 25% a mais de isolamentos bem sucedidos do que o enriquecimento selectivo directo das amostras.

Hoje em dia, utiliza-se o pré-enriquecimento não só em amostras submetidas a “stress” ambiental (pH, baixa aw, temperaturas fora do espectro admissível) mas para todas as amostras, inclusive em microbiologia alimentar, em que os níveis de nutrientes e humidade não são considerados críticos. O pré-enriquecimento ou o enriquecimento em duas fases encontra-se recomendado na maioria dos protocolos (NP-1933, 1982 e ISO 6579, 1993) de isolamento.

O pré-enriquecimento, além de revitalizar células danificadas pode favorecer o desenvolvimento da flora competidora, sobrepondo-se em número e mascarando a presença de *Salmonella*. Bernardo (1991) verificou esta possibilidade após a inoculação artificial de algumas amostras com baixos teores de *Salmonella*, surgindo com relativa frequência falsos negativos, nas amostras submetidas a pré-enriquecimento.

Também outros autores defendem a possibilidade do pré-enriquecimento ser dispensável e eventualmente contraproducente, nomeadamente se as amostras se encontram fortemente contaminadas, como as águas residuais e se o enriquecimento selectivo utilizado for o meio RV a 43 °C, de boa selectividade (Alcaide *et al.*, 1982). Porém, estudos anteriores defendem que, mesmo em amostras contaminadas, o pré-

enriquecimento deve ser efectuado: Harvey e Price (1977) conseguiram um maior número de amostras utilizando um pré-enriquecimento para o isolamento de salmonelas a partir de águas contaminadas por esgotos.

À luz destes trabalhos, torna-se difícil esclarecer se, em amostras fortemente contaminadas, a utilização de um pré-enriquecimento pode ser útil. Os diferentes estudos podem não ser comparáveis visto os caldos de enriquecimento terem evoluído e outros caído em desuso, correspondendo a diferentes graus de pressão selectiva. Verifica-se mesmo uma tendência para adoptar caldos de menor agressividade, recorrendo menos ao tetracionato largamente utilizado nos trabalhos mais antigos, como os de Harvey e Price (1977), podendo o pré-enriquecimento revelar-se indispensável nestes casos.

Poder-se-á considerar as amostras do presente estudo fortemente contaminadas visto serem constituídas na sua maioria por amostras de fezes. Não obstante esta forte flora bacteriana contaminante, as amostras foram submetidas, a diferentes graus de pressão desfavoráveis à multiplicação e dificilmente apreciáveis, antes do seu processamento laboratorial. A síntese destes diferentes elementos, e em conformidade com os protocolos recomendados na maior parte dos laboratórios, bem como as recomendações em estudos anteriores de pesquisa de *Salmonella* spp. em Larídeos (Fricker *et al.*, 1983), o pré-enriquecimento com APT foi sistematicamente utilizado.

3.4.2.3. Enriquecimento selectivo

O sucesso de um enriquecimento selectivo e do isolamento depende da capacidade de os inibidores que possui actuarem contra a flora Gram-positiva contaminante e contra outros microrganismos Gram-negativos competidores, nomeadamente as outras enterobacteriáceas. No caso do isolamento de Salmonelas das amostras recolhidas, este facto é particularmente importante, visto a flora competitiva Gram-negativa se encontrar em número elevado nas fezes, bem como a flora contaminante proveniente da areia que, forçosamente acompanhou o material fecal. Como seria previsível, os meios selectivos revelam-se mais eficientes em inibir as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas.

Habitualmente, os meios utilizados para a pesquisa de *Salmonella* spp. são meios líquidos, pois suportam uma maior quantidade de inóculo do que os meios sólidos. No entanto existem algumas excepções como o meio Rappaport-Vassiliadis semi-sólido.

O caldos contendo selenito (selenito-cistina ou selenito F) foram desenvolvidos por se revelarem superiores ao caldo de tetracionato, nomeadamente para o isolamento a partir de fezes de pacientes com febre tifóide. Embora de grande utilidade para o isolamento de *S. Typhi*, possui a desvantagem de não ser apropriado para o isolamento de *S. Choleraesuis* (Harvey e Price, 1979). No caso de amostras fortemente contaminadas, como as deste estudo, o caldo de selenito pode não inibir suficientemente a flora competidora, quer por comportar maior volume de inóculo da amostra e pela temperatura de incubação mais baixa em relação ao RV, quer por características inerentes à sua composição. Existem trabalhos que demonstraram que o caldo SC pode ser mais eficaz do que o caldo RV, apenas quando as amostras apresentam uma pequeníssima carga bacteriana, como isolamentos em amostras provenientes de tecido muscular (Bernardo, 1991). Também a baixa toxicidade dos caldos de selenito para algumas estirpes atípicas, importantes em Medicina Veterinária e Saúde Pública, como *S. Gallinarum* biótipos *gallinarum* e *pullorum*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, tem sido referida no trabalho de Bivet *et al.*, 1997.

O caldo de Rappaport-Vassiliadis contém como substâncias selectivas o cloreto de magnésio e o verde de malaquite. Rappaport *et al.* (1956, citado por Harvey e Price, 1979) utilizaram a propriedade de algumas Shigellas e Salmonelas sobreviverem à desidratação, enquanto a maior parte dos coliformes sucumbem, criando para este efeito um meio hiperosmótico e com um pH de 5,2. Mais tarde, Vassiliadis *et al.* (1976) diminuíram a concentração de corante para cerca de 1/3 da concentração inicial, permitindo desta forma que fosse incubado a 43 °C. No entanto, sendo esta temperatura considerada crítica para alguns serotipos, as normas internacionais e dos fabricantes recomendam a incubação a 42 °C (ISO 6579, 1993 e Anon, 1990), embora Vassiliadis *et al.* (1979) demonstrassem que o efeito inibidor é sempre máximo a 43 °C e Fricker *et al.* (1983) recomendassem esta temperatura no isolamento a partir de fezes de gaiivotas.

Neste rastreio registou-se uma diferença muito significativa entre a percentagem de isolados obtida a partir do enriquecimento com o meio Rappaport-Vassiliadis (RV) e selenito-cistina (SC), sendo consideravelmente maior para o primeiro. A reproductibilidade muito elevada obtida neste trabalho com o caldo RV a 42 °C parece ser concordante com o facto deste meio ser mais eficaz em isolar salmonelas do que o caldo SC quando as amostras se encontram fortemente contaminadas, quer as de origem alimentar (Busse, 1995; June *et al.*, 1995 e 1996), quer as de origem ambiental como as de água, eventualmente recorrendo à uma suplementação com novobiocina (Alcaide *et al.*, 1982 e 1984; Moriñigo *et al.*, 1986).

No que diz respeito à flora contaminante mais habitual, Papadopoulou e Xylouri (1989) inocularam artificialmente alguns enriquecimentos com 15 estirpes diferentes de enterobactérias, demonstrando a maior eficácia do caldo RV de que o SC na inibição do crescimento de *Proteus mirabilis*, *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli*. Estas espécies bacterianas formaram por vezes colónias nas geloses de isolamento neste trabalho, sendo esporadicamente identificadas quando da confirmação bioquímica através do sistema API 20E.

O meio utilizado neste trabalho, fabricado pela Oxoid, também parece ser mais selectivo do que os outros disponíveis no mercado ou do que os elaborados pelos próprios

microbiologistas, devido a apresentar uma maior concentração de cloreto de magnésio (Peterz et al., 1989).

No entanto, o compromisso entre nutrientes e inibidores parece não satisfazer todos os microbiologistas, pois certos autores denunciam uma agressividade excessiva de certos meios, afirmando mesmo que alguns inibidores reprimem tanto o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* como de *Salmonella* spp.. (Arroyo e Arroyo, 1995).

As modificações semi-sólidas do meio RV, permitem a expressão das características de mobilidade da maior parte das *Salmonella* e contém, geralmente, ainda menor concentração de corante do que os meios líquidos. Pensa-se que os meios RV semi-sólidos consigam mais facilmente detectar as estirpes lactose positivas, colmatando a inoperância dos protocolos tradicionais neste ponto (Busse, 1995).

Não se isolou neste trabalho nenhuma estirpe lactose positiva pertencente ao género *Salmonella*. Recorde-se que as salmonelas pertencentes às subespécies *S. arizonae* e *S. diarizonae* bem como cerca de 1% das pertencentes à subespécie *enterica* são lactose positivas (Le Minor, 1984). No entanto e relativamente a estas estirpes, algumas delas reconhecidas como patogénicas para o Homem, Ruíz *et al.* (1996a) não confirmaram a superioridade do RV semi-sólido.

A superioridade do meio RV semi-sólido em relação ao meio tradicional encontra-se largamente descrita, sobretudo na área da microbiologia alimentar, como as investigações de Perales e Audicana (1989) que demonstram claramente a sua eficácia, considerando-o dos enriquecimentos mais específicos. No entanto, esta superioridade por vezes não chega a ser estatisticamente significativa, como puderam verificar Beckers *et al.* (1985). Acrescendo-se a estes dados, encontram-se a peculiaridade de algumas estirpes poderem ser muito susceptíveis ao verde de malaquite, vendo a sua mobilidade diminuída, e de existir flora competidora móvel bem como serotipos de *Salmonella* não móveis.

O caldo de selenito-cistina poderia eventualmente ter sido dispensado no protocolo, visto nenhuma estirpe ter sido isolada somente a partir deste enriquecimento, sendo igualmente isolada nas sementeiras a partir do RV. Porém, o enriquecimento neste meio continua a ser recomendado, visto alguns serotipos poderem ser susceptíveis ao

corante e/ ou à temperatura mais elevada a que o RV é incubado, como parece estar confirmado para *Salmonella* Dublin (Fricker e Girdwood, 1984; Kalapothaki *et al.*, 1986).

Relativamente aos estudos de prevalência de *Salmonella* spp. em gaivotas, apenas um grupo de investigadores, Fricker *et al.* (1983) compararam a eficácia dos diferentes meios de enriquecimento utilizados. O meio de RV revelou ser superior no enriquecimento de 560 zaragatoas cloacais relativamente ao caldo de tetrionato e selenito F. Embora o RV fosse de maior eficácia absoluta, detectando um maior número de serotipos diferentes em relação ao Rappaport na sua fórmula original, incubada a 37 °C, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Note-se que no trabalho destes autores, o caldo de tetrionato foi superior ao caldo de selenito, reforçando a intuição da necessidade de utilizar meios de enriquecimento com elevada selectividade para este tipo de amostras.

3.4.2.4. Geloses de isolamento

Embora quase todos os autores sejam unânimes em afirmar que o caldo de enriquecimento mais apropriado para isolar salmonelas de amostras recolhidas do meio ambiente é o caldo RV encontra-se, no que diz respeito às geloses de isolamento, uma notável falta de consenso.

Observam-se também numerosas modificações nos meios usuais, com suplementações diversas, com a finalidade de aumentar as suas selectividades, como a adição de sulfadiazina, sulfamandelato ou novobiocina, dificultando grandemente a comparação das eficácias dos diferentes protocolos.

O meio sólido ideal para a pesquisa de *Salmonella* permite ao mesmo tempo um bom desenvolvimento do microrganismo desejado, fornecendo todos os nutrientes indispensáveis, um fácil reconhecimento das colónias suspeitas em relação aos outros microrganismos e, por fim, suprime os microrganismos competidores, particularmente os que formam colónias semelhantes.

Existem três tipos principais de geloses de isolamento para *Salmonella* spp. relativamente ao principal agente seleccionador:

- As que contém sais biliares como o SS agar, meio Hektoen e gelose XLD;
- As que contém verde brilhante, um corante da mesma família química que o verde de malaquite (os trifenilmetanos), como o meio BGA;
- As que contém sulfito de bismuto como o desoxilato-citrato agar ou o BSA, talvez o grupo mais selectivo e hoje em dia menos utilizado.

Neste trabalho, foram usados dois tipos de geloses em placa para o isolamento de colónias suspeitas, concretamente:

- O meio BGA, que utiliza o verde brilhante como agente selectivo e vermelho de fenol como indicador;

- O meio Hektoen, que utiliza sais biliares e desoxicolato de sódio como seleccionadores, fuscina ácida como indicador e ainda tiosulfato para permitir a produção de sulfureto de hidrogénio, actuando quer como indicador, quer como seleccionador.

No presente trabalho, a reproductibilidade do Hektoen foi 94,7%, ligeiramente superior à do BGA que foi 89,5%.

Fricker e Girdwood (1984) , compararam a eficácia de diferentes meios selectivos para o isolamento de salmonelas a partir de fezes de gaivotas. Embora o meio de Hektoen não fosse testado, estes autores demonstraram que o meio BGA com suplementação de sulfamandelato foi o mais eficaz e o BGA sem suplementação o menos eficaz. Também em fezes humanas, a suplementação deste tipo de meio parece ser importante para aumentar a especificidade: Ruíz et al. (1996b) encontraram o maior número de isolamentos utilizando NBGL, um meio contendo verde brilhante e suplementado com novobiocina. No entanto algumas suplementações, embora aumentando a inibição da flora competidora, podem revelar-se contraproducentes. Este facto foi verificado por Jones *et al.* (1984), em que o crescimento de alguns serotipos se encontravam diminuídos pela acção destas substâncias ou formavam colónias fastidiosas e de pequena dimensão, difíceis de identificar.

À semelhança do caldo RV, os meios com verde brilhante podem inibir o desenvolvimento de algumas estirpes mais sensíveis como *S. Dublin* (Harvey e Price, 1968 citado por Fricker e Girdwood, 1984).

O meio de Hektoen tem-se revelado bastante eficiente em amostras fortemente contaminadas, nomeadamente em inibir *Proteus mirabilis*. Este meio foi superior às outras geloses, incluindo o BGA em águas contaminadas por descargas de esgoto (Alcaide *et al.*, 1984). Neste trabalho, suspeitaram-se que algumas colónias poderiam pertencer ao género *Proteus* na gelose Hektoen, sendo posteriormente desprezadas através do teste da urease.

Dificultando de forma mais sistemática o isolamento de *Salmonella* spp., encontrou-se outro género bacteriano muito aparentado, o género *Citrobacter*, com

aspectos morfológicos muito idênticos as salmonelas no meio Hektoen, pela dimensão das colónias, produção de sulfureto de hidrogénio e consistência friável da colónia quando picada pela ansa. Neste ponto, o isolamento neste meio não permitiu uma boa diferenciação entre estes dois géneros bacterianos, possibilitando apenas a identificação de *Citrobacter* spp. quando se utilizou os soros anti-*Salmonella* polivalentes ou na reacção ONPG positiva na galeria API 20E.

Estudos anteriores reconheceram uma presumível dificuldade de diferenciação de algumas enterobacteriáceas com o meio HE, como as experiências de Moats (1981). Este investigador recorreu a contaminações artificiais de *Proteus* spp., *Edwardsiella* spp. e *Citrobacter freundii*. No entanto, esta aparente falta de inibição deste tipo de flora contaminante muito frequente nas fezes, não se expressou nos resultados: não só o meio HE foi ligeiramente superior ao BGA, como os escassos isolamentos resultantes do enriquecimento com selenito, supostamente menos inibidor que o RV, foram provenientes sempre das placas de HE.

3.4.3. Reprodutibilidade dos resultados

Por último, o apuramento dos resultados poderá ter sido influenciado por outros factores, nomeadamente, uma eventual subestimação das prevalências, decorrentes de:

- A ocorrência de microrganismos viáveis mas não cultiváveis, devido a pressões físicas, químicas e biológicas já mencionadas que poderão ocorrer tanto num período de pré-contaminação ou pós-excreção pelas aves: Vários estudos apontam para a deficiência dos métodos convencionais para a detecção de salmonelas em situações de “stress” ambiental, nomeadamente em ecossistemas aquáticos, particularmente os hipertónicos (Roszak *et al.*, 1983; Dupray *et al.*, 1997);
- O método de recolha das amostras não esgotar a possibilidade das aves estarem contaminadas e não excretarem os microrganismos, podendo estes estarem acantonados noutros órgãos: Monaghan *et al.* (1985) e Girdwood *et al.* (1985) encontraram um acréscimo até 20% nas prevalências de *Salmonella* spp. nas aves em que todo o intestino também tinha sido analisado; Também Gould e Fletcher (1978) encontraram modificações na proporção de determinados microrganismos conforme a maior percentagem da fracção urinária ou intestinal nos excrementos analisados;
- O completo desconhecimento da natureza e quantidade da flora bacteriana das amostras e a inevitável falta de homogeneidade destas, não possibilitou o ajustamento dos protocolos de pesquisa convencionais; As normas de pesquisa e os meios, normalmente ajustados à área da microbiologia alimentar, não foram certamente exaustivos: embora o aumento do número de meios utilizados, tempos e temperaturas de incubação poderia ter diminuído eventuais falsos negativos, tornar-se-ia proibitivo com respeito ao custo e ao tempo de investigação disponível, sem garantias de resultados mais fidedignos. A interação da flora competidora com as salmonelas presentes numa determinada amostra representa uma “caixa

negra” como afirmam Beckers *et al.* (1987), em que bactérias e nutrientes em conjunto têm um efeito imprevisível no desenrolar do isolamento.

CAPÍTULO IV- ESTUDO DE MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS

4.1.Objectivos

As gaivotas, para além de partilharem os respectivos biótipos com outras populações animais (peixes, moluscos, crustáceos e outras aves), compartilham espaços comuns à população humana.

As praias incluídas neste estudo constituem zonas de interface ecológica e locais privilegiados de contacto indirecto entre gaivotas e o homem. Com efeito, estas aves encontram-se cada vez em maior número junto das grandes cidades e pólos industriais circundantes, tirando partido, graças à sua adaptabilidade, da possível acessibilidade a um maior número de fontes alimentares.

Por outro lado, devido à densidade populacional em redor da costa da grande Lisboa, estas praias têm uma concorrência elevada, durante grande parte da Primavera e do Verão, e mesmo no Inverno, constituindo áreas de lazer, actividades lúdicas e físicas.

Por isso, foi considerado relevante efectuar tentativas para estabelecer eventuais correlações epidemiológicas entre os isolados de *Salmonella* spp. e os de maior frequência e susceptibilidade na população. Julgámos possível deste modo, avaliar a presença de um eventual risco para a saúde.

Para permitir a caracterização indirecta desse risco, foram usados três marcadores epidemiológicos: serotipificação, estudos de sensibilidade aos antibióticos e fagotipificação.

4.2. Material e métodos.

4.2.1. Serotipificação

Os isolados de *Salmonella* spp. foram enviados para Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) para caracterização antigénica.

A selecção dos isolados foi baseada em critérios objectivos, como o biotipo: Quando isolados da mesma amostra revelaram ter características bioquímicas diferentes, quer no meio TSI, quer na galeria API 20E, foram enviados separadamente para este laboratório.

No total foram serotipificados 99 isolados segundo o esquema de Spice- Edwards, recorrendo a soros anti-somáticos- O e soros anti-flagelares específicos.

4.2.2. Fagotipificação

As estirpes de *Salmonella* Typhimurium foram serotipificadas no Centro Nacional de Referência do Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, de acordo com o método de Callow, modificado por Anderson *et al.* (1977), utilizando uma bateria de 34 fagos.

4.2.3. Antibiogramas

Todos os isolados bioquimicamente e serologicamente caracterizados foram submetidos a testes de sensibilidade a antibióticos. Para este efeito, seguiu-se o método descrito na norma M31-T (Watts *et al.*, 1997). Esta norma recomenda o método de difusão em agar anteriormente descrito por Bauer *et al.* (1966), para germes comuns que se desenvolvem rapidamente e em aerobiose, como se verifica para as *Enterobacteriaceae*.

Utilizaram-se, para este teste, os seguintes antibióticos em discos:

- Beta-lactâmicos: Ampicilina 30 µg (Amp, Oxoid), cefalotin 30 µg (Kf, Oxoid) e cefotaxime 30 µg (Ctx, Oxoid);
- Sulfamidas: Composto de sulfamidas 300 µg (S3, Oxoid) e Sulfametoxazol-Trimetoprim 25 µg (Sxt, Oxoid);

- Quinolonas: Enrofloxacina 5 μg (Enr, Oxoid);
- Aminoglicosídeos: Estreptomicina 10 μg (S, Oxoid) e gentamicina 10 μg (Cn, Oxoid);
- Tetraciclina: Tetraciclina 30 μg (Te, Oxoid);
- Furanos: Nitrofurantoína 300 μg (F, Oxoid);
- Outros: Cloranfenicol 10 μg (C, Oxoid)

O meio de cultura utilizado foi a gelose de Mueller-Hinton (Oxoid CM337) preparada segundo as instruções do fabricante e distribuída em placas de Petri, obtendo-se uma espessura uniforme de 4 milímetros. Uma amostra de pelo menos uma placa de cada lote preparado foi submetida a uma prova de estufa a 37°C durante 24 horas para confirmar a sua esterilidade.

Foi igualmente preparado o padrão de opacidade recomendado pela norma, adicionando 0,5 ml de cloreto de bário de 0,048 mol. l⁻¹ a 99,5 ml de ácido sulfúrico a 0,18 mol. l⁻¹, obtendo desta forma uma solução correspondendo ao índice 0,5 da escala MacFarland.

Para cada lote de isolados de *Salmonella* spp. testados, foi utilizada paralelamente uma estirpe padrão de controlo sensível a todos os antibióticos: A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922.

Todas as suspensões bacterianas, incluindo a estirpe de controlo foram efectuadas em água destilada esterilizada, homogeneizadas em vórtex e ajustadas à concentração de 0,5 MacFarland. As placas foram semeadas com estrias muito densas recobrimo a totalidade do agar, utilizando para o efeito zaragatoas esterilizadas embebidas nas referidas suspensões.

Seguiu-se, nos 15 minutos após a sementeira das placas, a colocação dos discos de antibióticos. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h.

Findo o período de incubação, o diâmetro halos de inibição foram medidos e, recorrendo aos valores estabelecidos na norma M31-T (Watts *et al.*, 1997), foram classificados para cada antibiótico nas categorias sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R).

4.3.Resultados

4.3.1.Serotipos

Os isolados de *Salmonella* spp. pertencem a 14 serotipos diferentes, 13 pertencentes ao Grupo ou subespécie I (*Salmonella enterica* subespécie *enterica*) e 1 serotipo pertencente ao Grupo ou subespécie II (*S .enterica* sub. *salamae*) (quadro 4.3.1.1.).

Não foi possível serotipificar um dos isolados proveniente do lote 17 (amostra 34) visto se encontrar em fase rugosa. Nesta mesma amostra foram isolados 2 serotipos diferentes (*S. Derby* e *S. Hadar*).

Nas fezes, o serotipo de maior frequência foi *S. Typhimurium* (36,8%) (Gráfico 4.3.1.1). Outros serotipos encontrados foram: *S. Derby* (18,4%); *S. Enteritidis* (10,5%); *S. Agona* e *S. Hadar* (7,9%); *S. Goettingen*, *S. Newport* e *S. Virchow* (5,3%); *S. Bardo* , *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Ohio*, *S. Orion* e *S. II 1,4,12,27:b:-* (2,6%).

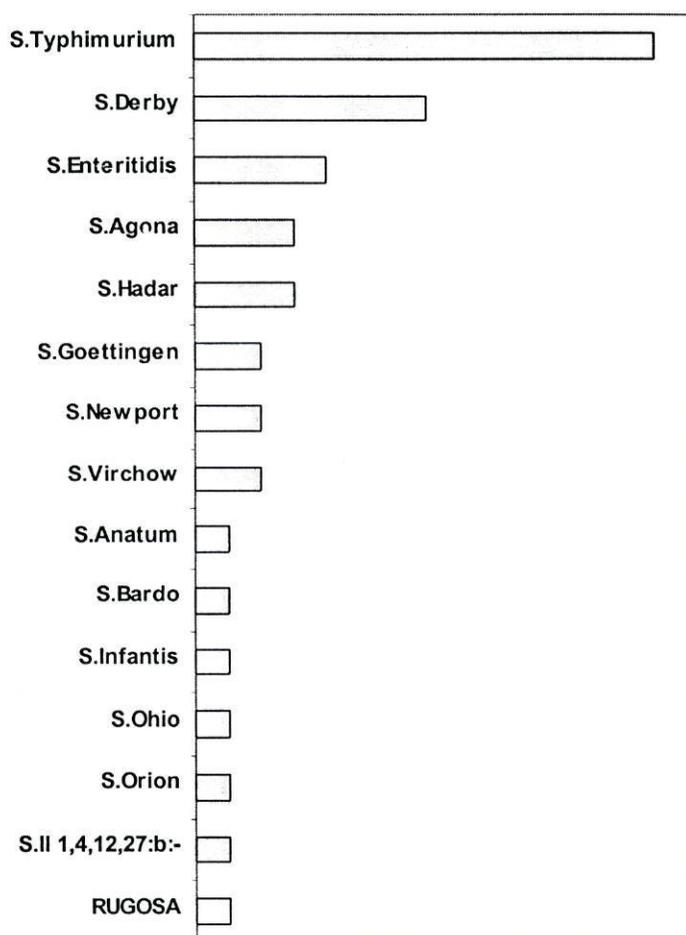
Das 14 amostras de onde se isolou *S. Typhimurium*, 2 amostras apresentavam *S. Typhimurium* 5 - (variedade Copenhagen) e as restantes 12, *S. Typhimurium* 5+

Os serotipos encontrados nas três amostras de água positivas foram *S. Anatum* (2 amostras) e *S. Derby* (1 amostra).

QUADRO 4.3.1.1. Distribuição dos serotipos em fezes.

SEROTIPO	Nºde amostras	%
S.Typhimurium	14	36,8%
S.Derby	7	18,4%
S. Enteritidis	4	10,5%
S. Agona	3	7,9%
S. Hadar	3	7,9%
S. Goettingen	2	5,3%
S. Newport	2	5,3%
S. Virchow	2	5,3%
S. Anatum	1	2,6%
S. Bardo	1	2,6%
S. Infantis	1	2,6%
S. Ohio	1	2,6%
S. Orion	1	2,6%
S. II 1,4,12,27:b:-	1	2,6%
RUGOSA	1	2,6%
TOTAL	44¹	

GRÁFICO 4.3.1.1.-Frequência dos serotipos em fezes



¹ 6 amostras estavam contaminadas simultaneamente com 2 serotipos diferentes

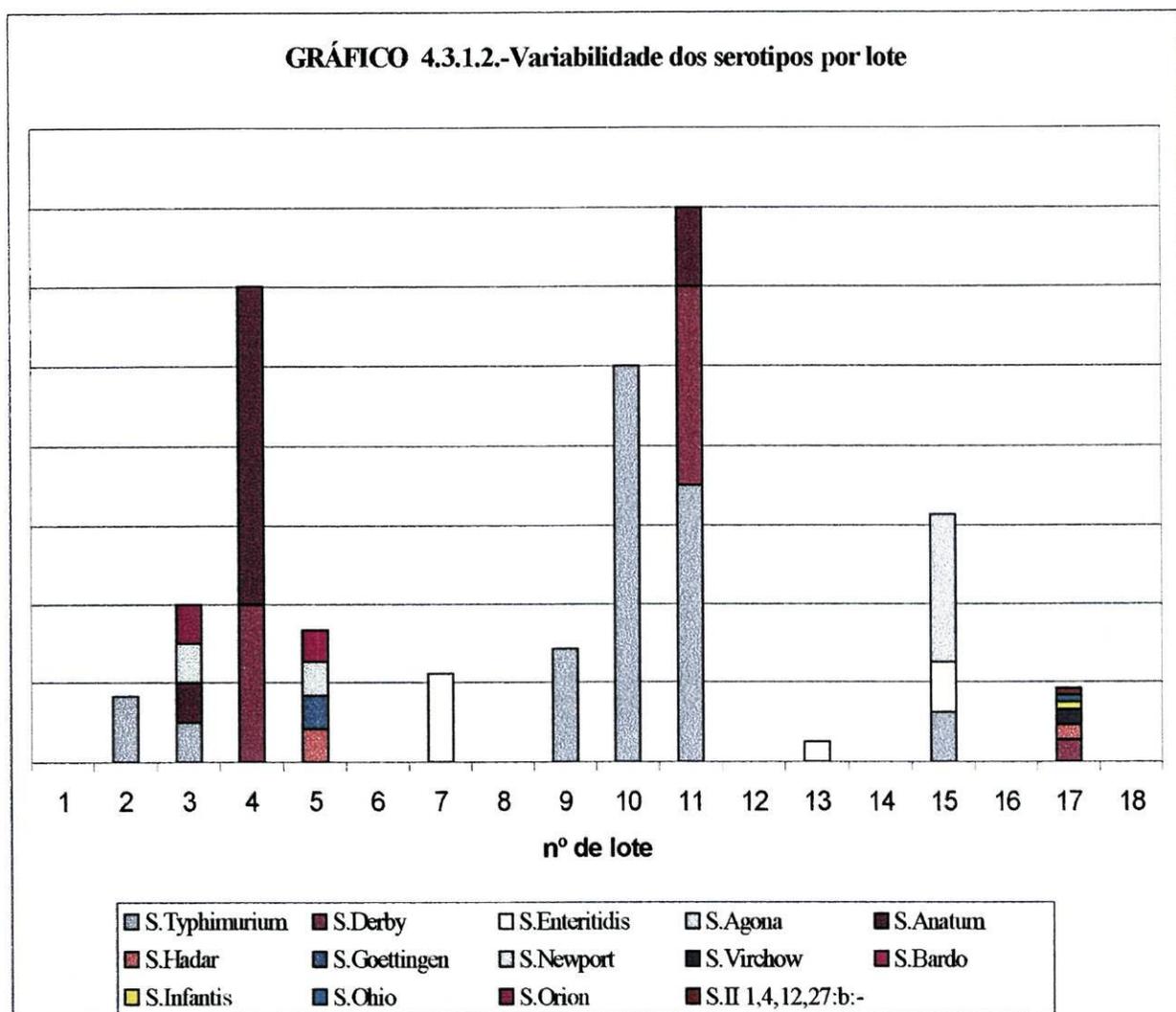
A variabilidade do número de serotipos diferentes encontrados dentro de um mesmo lote foi grande, observando-se desde um único serotipo (5 lotes) até 6 serotipos diferentes no lote 17 (Praia da Fonte da Telha) (Gráfico 4.3.1.2.).

Registaram-se dois tipos de lotes uniformes:

- 3 lotes identificando-se apenas *S. Typhimurium*: lote 2 e 10 (praia de Santo Amaro) e lote 9 (praia da Torre);

- 2 lotes identificando-se apenas *S. Infantis*: lote 7 (praia de Carcavelos) e 13 (praia de Paço de Arcos).

GRÁFICO 4.3.1.2.-Variabilidade dos serotipos por lote



4.3.2. Antibiogramas e fagotipos

Cerca de 1/3 dos isolados não apresentaram qualquer tipo de resistência aos antibióticos utilizados (31,30%) (Quadro 4.3.3.1).

Os outros isolados apresentaram resistências simples em 17,17 % dos casos e resistências múltiplas em 51,52% dos casos, com um máximo de resistência registrado a 8 antibióticos simultaneamente.

QUADRO 4.3.2.1.- Perfis de antibioresistências dos isolados e respectiva frequência por ordem decrescente.

PERFIL	Nº de ISOLADOS	%
Sensível	31	31,31%
S ^R	8	8,08%
Am ^R +C ^R + S ^R + Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R	8	8,08%
Te ^R	7	7,07%
S ^R + Te ^R + S3 ^R	6	6,06%
Am ^R +C ^R + S ^R + Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R +Fd ^R + Cn ^R	4	4,04%
S ^R + Te ^R	3	3,03%
S ^R + Sxt ^R + S3 ^R	3	3,03%
Am ^R + S ^R + Te ^R + S3 ^R	3	3,03%
Am ^R + S ^R + Te ^R +Kf ^R	3	3,03%
Am ^R +C ^R + S ^R + Te ^R + S3 ^R	3	3,03%
Fd ^R	2	2,02%
Te ^R + S3 ^R	2	2,02%
Te ^R +Sxt ^R + S3 ^R	2	2,02%
Am ^R +Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R	2	2,02%
Am ^R +C ^R + S ^R +Sxt ^R + S3 ^R + Cn ^R	2	2,02%
Am ^R +C ^R + S ^R + Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R + Cn ^R	2	2,02%
Am ^R +Kf ^R	1	1,01%
Sxt ^R +S3 ^R	1	1,01%
Am ^R + S ^R	1	1,01%
Te ^R +Kf ^R	1	1,01%
Am ^R + Te ^R +Kf ^R	1	1,01%
Am ^R + Kf ^R + Fd ^R	1	1,01%
Am ^R +C ^R + S ^R + Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R +Kf ^R	1	1,01%
Am ^R +S ^R +Te ^R + Sxt ^R + S3 ^R	1	1,01%

Não se observaram resistências a dois antibióticos no conjunto dos 99 isolados: ao cefotaxime (cefalosporina de 3ª geração) e à enrofloxacina (fluoroquinolona).

Apenas se verificaram resistências individuais para três tipos de antibióticos: a estreptomicina, tetraciclina e nitrofurantoína. Estes dois últimos pertencem a grupos químicos à parte, não tendo sido utilizado nenhuma outra substância da mesma família. No caso da estreptomicina, registou-se o maior número de resistências individuais (8 isolados). Sistemáticamente, para o outro aminoglicosídeo usado, a gentamicina, registou-se sempre a presença de resistência à estreptomicina.

As estirpes testadas que apresentaram maior antibioresistência (8 antibióticos) pertenciam na totalidade ao serotipo *S. Typhimurium* 5+, assim como a maior parte dos isolados que apresentavam o perfil $Am^R+C^R+S^R+Te^R+Sxt^R+S3^R$. Um conjunto de 11 isolados com estas características foram fagotipificados correspondendo a dois tipos fágicos diferentes:

- PT additional 10, em 6 isolados, provenientes de 5 amostras diferentes;
- PT 12, em 5 isolados, provenientes de 3 amostras diferentes.

4.4. Discussão

4.4.1. Serotipos

O marcador mais frequentemente utilizado para inferir a relação entre a contaminação, de uma dada amostra, e o contágio humano ou animal é a serotipificação. Neste trabalho foram encontrados 14 serotipos diferentes, entre os quais um serotipo da subespécie II, nunca previamente isolado em Portugal e outros raramente associados a surtos de toxinfecção alimentar como *S. Orion*. Estes serotipos poderão eventualmente estar presentes na população humana e animal, mas raramente referidos visto efectuarem-se a isolamentos maioritariamente em situações clínicas, verificadas com os serotipos mais virulentos.

Os serotipos encontrados com maior frequência em humanos em Portugal são *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Saintpaul*, *S. Derby* e *S. Agona* (Bernardo, 1991). Todos foram, exceptuando *S. Saintpaul*, isolados nas amostras recolhidas no presente trabalho.

O serotipo claramente mais frequente nas amostras positivas foi *S. Typhimurium*, contabilizando quase 1/3 do total de estirpes isoladas.

S. Typhimurium parece ser um serotipo frequente em aves silvestres, nomeadamente nas que compartilham os seus habitats com os humanos. Com efeito este foi o serotipo mais frequente nas prevalências calculadas em pombos, na cidade de Lisboa, por Rodeia *et al.* (1994).

Noutros trabalhos relativos à ocorrência de *Salmonella* em Larídeos, também se registaram frequências elevadas deste serotipo, sendo o mais frequente nas investigações de Williams *et al.* (1976), Gould e Fletcher (1978), Benton *et al.* (1983); Kapperud e Rosef (1983), Cízek *et al.* (1995), Hubálek *et al.* (1995), Palmgren *et al.* (1997), e o segundo mais frequente, a seguir a *S. Virchow*, nos estudos de Girdwood *et al.* (1985), Monaghan *et al.* (1985), ambos realizados na Escócia, em curtos intervalos de tempo.

Em Portugal, até 1981, *S. Typhimurium* foi o serotipo mais isolado nos humanos, sendo actualmente e desde de 1982, *S. Enteritidis* o de maior prevalência (Bernardo e Machado, 1989; Machado e Pires, 1990). A vasta distribuição de *S. Typhimurium* no meio ambiente, nomeadamente num número elevado de espécies animais, facilita certamente a sua dispersão por animais silvestres portadores potenciais.

O segundo serotipo mais frequente, *S. Derby* foi isolado pela primeira vez no nosso país em 1971. Em microbiologia alimentar, existem numerosas referências à presença deste serotipo em suínos, particularmente no nosso país, onde foi o serotipo mais isolado num estudo efectuado por Bernardo (1991) nesta espécie.

O número de casos humanos devidos a este serotipo, anualmente diagnosticados em Portugal, não tem ultrapassado a meia dezena, à excepção dos anos de 1984 e 1985 em que se registaram cerca de 20 (Machado e Pires, 1990). As carnes de suíno são, por certo, o mais importante veículo deste agente. Como já foi referido, os Larídeos tem especial atracção para efluentes de matadouros, como também se conhece existir um número

elevado de suiniculturas entre o estuário do Tejo, local da amostragem, e a principal colónia reprodutora do nosso país, as ilhas Berlengas.

O terceiro serotipo mais frequente, encontrado em 10,5 % das amostras foi *S. Enteritidis*. Assiste-se, hoje em dia, à dominância acentuada deste serotipo em situações mórbidas nos humanos, especialmente o tipo fágico 4 (PT 4), tendo aumentado grandemente em vários países ao longo das duas últimas década, sendo principalmente veiculado pelos ovos e seus derivados (Rodrigue *et al.*, 1990).

Em Portugal, *S. Enteritidis* é responsável por mais de 70% dos casos de infecção notificados, estando também registada a sua dominância noutros países como em Espanha (Alonso *et al.*, 1987) e no Reino Unido (Humphrey *et al.*, 1989; Wall *et al.*, 1997).

Nalguns países, devido à adopção de medidas drásticas de controlo nos efectivos avícolas, este serotipo tem diminuído, havendo um aumento exponencial de *S. Typhimurium*, nomeadamente do fagotipo DT 104, na Alemanha (Almut *et al.*, 1997), Inglaterra e País de Gales (Wall *et al.*, 1997).

No ecossistema marinho, *S. Enteritidis* foi isolado em Cetáceos e Pinípedes (Minette, 1986) e em Pinguins (*Pygoscelis papua*) (Olsen *et al.*, 1996). Em Portugal foram assinalados elevados níveis de contaminação, por este serotipo, em bivalves do estuário do Tejo, nomeadamente, em lambujinhas e mexilhões (Nunes, 1990). No entanto, a prevalência de um determinado serotipo em bivalves parece variar grandemente com a localização, não sendo este serotipo sistematicamente mais frequente. Com efeito, na Bretanha, em França, num rastreio de *Salmonella* em bivalves este serotipo não foi encontrado, sendo *S. Panama* o serotipo mais frequente (Monfort *et al.*, 1997).

Muitos dos restantes serotipos encontrados, no presente rastreio, foram isolados no nosso país em espécies animais comestíveis, como Bernardo (1991) verificou para *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Newport*, *S. Ohio* e *S. Virchow*. Este último serotipo é dos agentes mais frequentes de salmonelose humana em muitos países. Nos Larídeos, este serotipo foi encontrado predominantemente na Escócia, onde se registavam incidências elevadas em humanos como verificaram Girdwood *et al.* (1983). Também em análises de efluentes urbanos, perto de Glasgow, foi o serotipo mais frequente quer no esgoto, quer nas gaivotas, como constatou Fricker (1984). Neste último trabalho, a correlação entre serotipos nas águas de esgoto e gaivotas foi espacial e temporal, havendo diferenças de

escassos dias entre a presença de determinados serotipos em ambas as amostras. A opinião deste investigador foi fundamentada no facto de ter isolado do esgoto um serotipo pouco usual na Escócia, *S. Takoradi*, estando poucos dias depois presente nas fezes de *Larus ridibundus*.

Parecem existir, segundo estes autores, indícios de estreitas correlações entre os serotipos dominantes nos humanos e animais, de determinadas áreas geográficas, com os dos Larídeos. Em Portugal o serotipo com maior morbilidade permanece *S. Enteritidis*, o 3º serotipo de maior frequência neste trabalho.

Também noutros estudos de prevalência de *Salmonella* em gaivotas, como os de Hubálek *et al.* (1995) e Cízek (1995) na República Checa, onde o serotipo de maior frequência foi *S. Typhimurium*, não se verificou correspondência com o serotipo mais frequente em humanos naquele país: Karpísková *et al.* (1997) afirmaram que em 1995, este serotipo apenas representava 2,1% dos isolamentos, enquanto 95,5% correspondiam a *S. Enteritidis*.

As escassas amostras de águas analisadas neste trabalho, colhidas em pontos em que constava a presença efectiva de gaivotas, revelaram dois serotipos diferentes *S. Anatum* (2 amostras), e *S. Derby* (1 amostra). Estes dois serotipos também foram isolados nas fezes.

A falta de correspondência na totalidade dos serotipos isolados nas análises das prováveis fontes alimentares e com os encontrados nas aves estudadas, como registou Fricker (1984), revela existirem complexas conexões epidemiológicas, não inteiramente elucidadas, entre todos os intervenientes na transmissão de salmonelas aos Larídeos.

A virulência acentuada de *S. Enteritidis*, nomeadamente o tipo PT 4, também contribuí certamente para o maior número de isolamentos nos humanos, já que muitos dos casos de salmonelose, nomeadamente os assintomáticos, não são registados no nosso país. Os aspectos da epidemiologia ligados à infecção humana em Portugal carecem estudos mais aprofundados dos respectivos marcadores para melhor se poder estabelecer relações epidemiológicas seguras entre animais silvestres e infecções no Homem.

4.4.2. Antibioresistências e fagotipos

Uma grande parte dos isolados testados apresentaram resistências. O serotipo que apresentou maior número de resistências, a 8 antibióticos simultaneamente, foi *S. Typhimurium* 5+, o que contrastou fortemente com os isolados *S. Typhimurium* 5- (variedade Copenhagen). Estes apresentaram, do conjunto de 5 isolados, apenas dois com resistências simples à estreptomicina.

À luz destas múltiplas resistências verificadas para alguns isolados de *S. Typhimurium* 5+, procedeu-se à fagotipificação com o intuito de verificar a possibilidade de alguns isolados serem DT 104, um tipo fágico $Am^{R+C^R} S^{R+} Te^{R+} S3^R$, o segundo de maior prevalência em muitos países europeus, e cujo crescimento acentuado é já preocupante; Além de apresentar resistências múltiplas, *S. Typhimurium* DT 104 é particularmente resistente no meio ambiente e a agentes desinfectantes (Humphrey *et al.*, 1997). Não se encontrou nenhum isolado *S. Typhimurium* DT 104 naqueles que apresentaram resistências complexas.

Um dos tipos fágicos encontrados, PT additional 10 é frequente no nosso país, comparativamente aos outros países da Europa.

Dos trabalhos anteriores, que avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em Larídeos e em que os isolados *S. Typhimurium* foram testados quanto à sua antibioresistência, Palmgren *et al.* (1997) também encontraram resistências múltiplas em dois tipos fágicos diferentes. Também Sixl *et al.* (1997) realizaram antibiogramas a partir das estirpes de *S. Typhimurium* isoladas de *L. ridibundus*, encontrando 33% de estirpes sensíveis ao conjunto dos antibióticos e as restantes com resistências várias, verificando-se o maior número de resistências para o sulfametoxazol-trimetoprim.

Registaram-se outros isolados com elevadas resistências à bateria de antibióticos utilizada, em particular todos os que pertenciam ao serotipo *S. Ohio*: em 5 isolados testados, 4 apresentavam o perfil $Am^{R+C^R} S^{R+} Te^{R+} Sxt^{R+} S3^R$ observando-se, para um deles, uma possível resistência plasmídica ao cefalotin. O outro isolado, pertencente a este serotipo, também apresentou uma resistência complexa com o perfil $Am^{R+C^R} S^{R+} Te^{R+} Sxt^{R+} S3^R Cn^R$.

Os isolados de *S. Enteritidis* revelaram menores antibioresistências que *S. Typhimurium* 5+. Este facto parece concordar plenamente com a virulência deste serotipo não assentar em múltiplas antibioresistências, mas em mecanismos de patogenia mais hábeis, acantonando-se em outros órgãos além do tracto intestinal, nomeadamente os linfonodos. Estas características permitem, inclusive, a manutenção de elevados níveis de incidência em efectivos avícolas e um dos motivos pelos quais se torna difícil empreender medidas profiláticas (Bernardo, 1991).

Com efeito, dos 9 isolados testados pertencentes a este serotipo, 4 revelaram resistências, 2 isolados de perfil $Te^R+Sxt^R+S3^R$, provenientes da mesma amostra e 2 isolados de perfil $S^R+Sxt^R+S3^R$, provenientes de duas amostras diferentes mas do mesmo lote.

Notou-se que, alguns serotipos exóticos, apresentaram algumas resistências, mas não sistematicamente em todos os isolados: *S. Orion*, 1 isolado Fd^R e *S. II 1,4,12,27:b:-*, 2 isolados com resistências simples à tetraciclina e outro à estreptomicina.

As crescentes resistências de inúmeras estirpes bacterianas, verificadas na actualidade, a uma multiplicidade de agentes quimioterápicos, já é alarmante, em particular devido ao facto de a descoberta de novas moléculas, não acompanhar o ritmo de desenvolvimento das resistências.

O número elevado de isolados com resistências, muitas delas múltiplas, que obtivemos neste trabalho, comprova que salmonelas sujeitas a elevadas pressões de antibióticos estão presentes nos Larídeos estudados, demonstrando que a sua origem terá sido provavelmente em resíduos sólidos ou efluentes provenientes da actividade humana, reforçando a possibilidade destas aves poderem ser utilizadas como marcadores indirectos da contaminação ambiental do seu habitat.

CONCLUSÕES GERAIS

O estudo das prevalências de *Salmonella* spp. em Larídeos, rastreados em algumas praias da grande Lisboa, bem como a pesquisa de alguns marcadores epidemiológicos, permitiu obter as seguintes conclusões:

1. As diferentes espécies de gaivotas constituem um grupo de aves cuja evolução demográfica, verificada nas últimas décadas, tem ocasionado um crescente número de situações de conflictualidade nos ecossistemas de que fazem parte, incluindo a interação com o homem. A sua notável adaptabilidade permite-lhes usar quase todas as fontes alimentares, incluindo algumas menos nobres, particularmente as que são confinadas e concentradas sem um adequado tratamento sanitário;
2. Os diferentes estudos acerca da frequência de *Salmonella* spp., em Larídeos demonstram que as prevalências são fortemente afectadas pela adaptação a recursos alimentares não naturais, mais do que a variabilidade específica ou pela localização geográfica dos bandos;
3. O protocolo de análise utilizado na pesquisa de *Salmonella* em microbiologia alimentar pode não ser o mais ajustado a este tipo de amostra, embora se tenha verificado uma boa eficácia nos isolamentos, com relativamente poucos germes competidores;
4. Os marcadores epidemiológicos investigados demonstram que as aves amostradas albergavam serotipos que também são isolados em humanos e animais no nosso país. O elevado número de antibioresistências verificadas sustenta a hipótese das estirpes isoladas serem provenientes de resíduos de variadas actividades humanas. Algumas amostras de água, mesmo se não estatisticamente significativas, revelaram-se extremamente contaminadas. Deste modo, a possibilidade destas aves, que frequentam as praias, se furtarem

a uma eventual contaminação foi impossibilitada, determinando inevitavelmente o seu comprometimento. As gaivotas poderão, desta forma, serem adoptadas como valiosos indicadores do grau de contaminação ambiental de determinadas áreas geográficas;

5. A elevada mobilidade e capacidade de dispersão destas aves, concretizada a dois níveis, diariamente e nas migrações de Inverno, possibilita a cobertura de toda a extensão da costa Portuguesa, Norte de África e outros países da Europa. Torna-se desta forma possível actuarem como potenciais disseminadoras de alguns agentes patogénicos, permitindo a sua introdução em áreas consideradas indemnes;
6. Embora todas as provas circunstanciais estejam presentes, torna-se imperativa uma avaliação, mais aprofundada, de todos os intervenientes nos ciclos epidemiológicos por forma a estabelecer correlações causa-efeito definitivas. Também se revela essencial aferir as repercussões que os crescentes esforços de tratamento de resíduos sólidos e efluentes empreendidos no nosso país, nomeadamente o novo sistema de saneamento da Costa do Estoril, poderão ter nas prevalências de *Salmonella* nos Larídeos presentes no estuário do Tejo.

BIBLIOGRAFIA

1. -Alcaide, E.; Martínez, J. P.; Martínez-Germes, P. & Garay, E. (1982)- Improved *Salmonella* recovery from moderate to highly polluted waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**: 143-6.
2. -Alcaide, E.; Martínez, J. P. & Garay, E. (1984)- Comparative study on *Salmonella* isolation from sewage-contaminated natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**: 365-71.
3. -Almut, L.; Prager, R.; Streckel, W.; Rabsch, W.; Gericke, B.; Seltmann, G.; Helmuth, R. & Tschäpe, H. (1997)- *Salmonella enterica*, serovar Typhimurium, phage type DT 104 is going to displace the present epidemic type PT4 of serovar Enteritidis in Germany. *Salmonella and Salmonellosis '97/ 601*, Ploufragan, France.
4. -Alonso, J. L. (1992)- *Salmonella* detection in marine waters using a short standard method. *Wat. Res.*, **26** (7) 973-8.
5. -Alonso, R.; Echeita, A., Espinhosa, P. & Usera, M. A. (1987). Attempts to establish phage typing as an epidemiological marker for *Salm. enteritidis*. *Ann. Inst. Pasteur (Microbiol.)*, **139**: 579-585.
6. -Anderson, E. S.; Ward, L.R.; Saxe, M.J. & Sa, J. D. H. (1977)- Bacteriophage-typing designations of *Salm. Typhimurium*. *J. Hyg. (Camb.)*, **78**: 297-300.
7. -Anónimo (1990)-*The Oxoid Manual* - 6ª edição, Hampshire, U.K, pp.352.
8. -Anónimo (1997a)- Saneamento da Costa do Estoril: Um sucesso inacabado. *Forum ambiente*, (43) 38-44.
9. -Anónimo (1997b)- Qualidade das águas balneares das diferentes praias do concelho de Cascais e Oeiras. *Jornal "A Linha"* de 15 de Agosto, pag. 3.
- 10.-Araújo, P. (1997)- Bactérias e fungos: encontros indesejáveis à beira-mar. *Forum ambiente*, (39) 60-1.
- 11.-Arroyo, G. & Arroyo, J. A. (1995)- Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**: 360-7.
- 12.-Barnes, E. M. (1979)- The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**: 407-19.
- 13.-Barnes, E. M.; Impey, C.S. & Cooper, D.M. (1980)- Competitive exclusion of salmonellas from the newly hatched chick. *Vet. Rec.*, **106**: 61.
- 14.-Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turk, M. (1966)- Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-6.

- 15.-Beckers, H. J.; Van Leusden, F. M.; Meijssen, M. J. M. & Kampelmacher, E. H. (1985)- Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of *Salmonella* in foods and feedstuffs. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**: 507-12
- 16.-Beckers, H. J.; Heide, J. V. D.; Fenigsen-Narucka, U. & Peters, R. (1987)- Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmanns' tetrathionate medium. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**: 97-104.
- 17.-Benton, C.; Khan, F.; Monaghan, P.; Richards, W. N. & Shedden, C. B.(1983)- The contamination of a major water supply by gulls (*Larus* sp.). A study of the problem and remedial action taken. *Wat. Res.*, **17**: 789-98.
- 18.-Bermejo, A.; Carrera, E.; De Juana, E. & Teixeira, A. (1986)- Primer censo general de gaviotas y charranes (*Laridae*) invernantes en la Peninsula Iberica (Enero de 1984). *Ardeola.*, **33** (1-2) 47-68.
- 19.-Bernardo, F. M. A & Machado, J. C. C. (1989)- Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em Portugal, perspectiva epidemiológica em humanos. *Rev. Port. Ciências Vet.*, **84**: 31-45.
- 20.-Bernardo, F. M. A. (1991)- Significado epidemiológico da incidência de *Salmonella* em alguns alimentos de origem animal em Portugal (Tese de Doutoramento) Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, pp: 270.
- 21.-Bernardo, F.M.A. & Pereira, F. S. (1998)- Incidência de *Salmonella* spp. em ovos de Larídeos da reserva natural das Berlengas (não publicado).
- 22.-Bitton, G (1994)- *Wastewater microbiology*. J. Wiley & Sons, New-York, U.S.A, 130-1.
- 23.-Blivet, D.; Salvat, G.; Humbert, F; Colin, P. (1997)- Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products. *Intern. J. Food Microbiol.*, **38**: 211-6.
- 24.-Brown, K. M. & Ewins, P. J. (1996)- Technique-dependent biases in determination of diet composition: an example with ring-billed gulls. *The Condor*, **98**: 34-41.
- 25.-Bruun, B; Delin, H. & Svensson, L. (1995)- *Aves de Portugal e Europa*. Guias FAPAS., Pelouro do Ambiente, Câmara Municipal do Porto (2ª edição revista), 142-53.
- 26.-Bukacinska, M; Bukacinska, D. & Spaans, A.L. (1996)- Attendance and diet in relation to breeding success in herring gulls (*Larus argentatus*). *The Auk.*, **113**: 2: 300-9.
- 27.-Busse, M. (1995)- Media for *Salmonella*. *Intern. J. Food Microbiol.*, **26**:117-31
- 28.-Butterfield, J.; Coulson, J. C.; Kearsey, S. V.; Monaghan, P.; McCoy, J.H. & Spain; G.E. (1983). The herring gull *Larus argentatus* as a carrier of *Salmonella*. *J. Hyg. Camb.*, **91**: 429-36.

- 29.-Casanovas, L.; Símon, M.; Ferrer, M. D.; Arqués, J. & Monzón, G. (1995)- Intestinal carriage of campylobacters, salmonellas, yersinias and listerias in pigeons in the city of Barcelona. *J. Appl. Bacteriol.*, **78** (1) 11-3.
- 30.-Cízek, A.; Literák, I.; Hejlíček, K.; Tremel, F. & Smola, J. (1994)- *Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds. *Zentralbl. Veterinarmed.*, **41** (5) 320-7.
- 31.-Chabrzyk, G. & Coulson, J. C. (1976)- Survival and recruitment in the herring gull *Larus argentatus*. *J. Anim. Ecol.*, **45**: 187-203.
- 32.-Coulson, J. C.; Butterfield, J. & Thomas, C. (1983)- The herring gull *Larus argentatus* as a likely transmitting agent of *Salmonella montevideo* to sheep and cattle. *J. Hyg. (Camb.)*, **91**: 437-43
- 33.-Coulson, J. C. & Butterfield, J. (1986)- Studies on a colony of color-ringed Herring gulls: II. Colony occupation and feeding outside de breeding season. *Bird Study*, **33**: 55-9
- 34.-Cramp, S. & Simmons, K. E. L. (1983)- *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa- The birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press, Vol III: Waders to Gulls, 697-837.
- 35.-Crewe, S. M. (1967)- Worm eggs found in gull droppings. *Ann. Tropical Med. Parasitol.*, **61**: 358.
- 36.-Danielsson, M. L (1977)- *Salmonella* in Sewage and Sludge. Serologic Profiles of Isolates, their Removal and/or Survival in Relation to Potencial Health Hazards to Man and Animals. *Acta Scandinavia*. Supplementum 65: 1-126.
- 37.-Dominguez, L. G. & De Juana, E. (1984)- Aspectos de la invernada de *Larus ridibundus* en Madrid. *Ardeola.*, **31**: 123-8.
- 38.-Dupray, E.; Derrien, A.; Langonne, C. (1997)- Influence of Solar Light on the Viability of *Salmonella* in marine water. *Salmonella and Salmonellosis '97*/ 435-437, Ploufragan, France.
- 39.-Durrant, D. S. & Beatson, S. H. (1981)- Salmonellae isolated from domestic meat waste. *J. Hyg. (Camb.)*, **86**: 259-64.
- 40.-Faddoul, G. P.; Fellows, G.W. & Baird, J. (1966)- A survey of the incidence of salmonellae in wild birds. *Avian Dis.*, **10**: 185-202.
- 41.-Feacham, R.; Bradley, D. J.; Garelik, H. & Duncanmara, D. (1983)- *Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management*. Wiley & Sons, New-York, U.S.A, 251-64.
- 42.-Fenlon, D. R. (1981)- Seagulls (*Larus* spp.) as vectors of salmonellae: an investigation into the range of serotypes and numbers of salmonellae in gull faeces. *J. Hyg. (Camb.)*, **86**: 195-202.

- 43.-Fenlon, D. R. (1983)- A comparison of salmonella serotypes found in the faeces of gulls feeding at a sewage works with serotypes present in the sewage. *J. Hyg. (Camb.)*, **91**: 47-52.
- 44.-Fricker, C. R.; Girdwood, R. W. A. & Munro, D. (1983)- A comparison of enrichment media for the isolation of salmonellae from seagull cloacal swabs. *J. Hyg. (Camb.)*, **91**: 53-58.
- 45.-Fricker, C. R. (1984)- A note on *Salmonella* excretion in the black headed gull (*Larus ribibundus*) feeding at sewage treatment works. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**: 499-502.
- 46.-Fricker, C. R. & Girdwood, R. W. A. (1984)- The effect of the use of different selective media on the ability to recover salmonellae from seagull faeces. *J. Hyg. (Camb.)*, **93**: 35-42.
- 47.-Furness, R. W. & Monaghan, P. (1987)- Seabirds as pests. In *Seabird Ecology*. Chapman & Hall, New York, 129-30.
- 48.-Garcia, R. (1997a)- À procura das gaivotas urbanas. *Jornal O Público*, 13 de Abril de 1997, p.46.
- 49.-Garcia, R. (1997b)- Berlenga à espera de novas medidas. *Jornal O Público*, 13 de Abril de 1997, p.46.
- 50.-Gidwood, R. W.; Fricker, C. R.; Munro, D. & Monaghan, P. (1985)- The incidence and significance of salmonella carriage by gulls (*Larus* spp.) in Scotland. *J. Hyg. (Camb.)*, **95**: 229-41.
- 51.-Gledel, J. (1984)- Role des réservoirs et de l' environnement dans la salmonellose bovine. *Comunic. Pessoal*, 39-70.
- 52.-Gould, D. J. & Fletcher, M. R. (1978)- Gull droppings and their effects on water quality. *Wat. Res.*, **12**: 665-72.
- 53.-Granadeiro, J. P.; Silva, M. A.; Fernandes, C. & Reis, A. (1997)- Beached bird surveys in Portugal 1990-1996. *Ardeola*, **44** (1) 9-17.
- 54.-Guerra, M. M. M.; Duarte, E. L. & Bernardo, F. M. A. (1999)- Ocorrência de *Listeria* spp. em fezes de gaivotas. Comunicação apresentada no 1º Colóquio sobre Sanidade da Fauna Silvestre, Paredes de Coura, Portugal, 10 a 19 de junho.
- 55.-Harvey, R. W .S. & Price, T. H. (1977)- Observations on pre-enrichment for isolating salmonellas from sewage polluted natural water using Muller-Kauffmann tetrathionate broth prepared with fresh and desiccated ox bile. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**: 145-8.
- 56.-Harvey, R. W. S. & Price, T. H. (1979)- Principles of Salmonella isolation. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**: 27-56.

- 57.-Hoszowski, A. & Truszczynski, M. (1997)- Prevention of *Salmonella typhimurium* caecal colonization by diferent preparations for competitive exclusion. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **20** (2) 111-7.
- 58.-Hubálek, Z.; Sixl, W.; Mikulásková, M.; Thiel, W.; Halouzka, J.; Juricová, Z.; Rosický, B.; Mátlová, L.; Honza, M.; Hájek, V. & Sitko, J. (1995)- Salmonellae in gulls and other free-living birds in the Czech Republic. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.*, **3** (1) 21-4.
- 59.-Humbert, F.; Carramiñana, J. J.; Lalande, F & Salvat, G. (1997)- Bacteriological monitoring of *Salmonella enteritidis* carrier birds after decontamination using enrofloxacin, competitive exclusion and movement of birds. *Vet. Rec.*, **141** (12) 297-9.
- 60.-Humphrey, T. J.; Baskerville A.; Mawer S.; Rowe B. & Hopper S. (1989)- Salmonella enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidem. Inf.*, **103**: 415-423.
- 61.-Humphrey, T. J.; Williams, A. & McAlpine, K. (1997)- The relationship between tolerance and virulence in *S. enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* DT104. Salmonella and Salmonellosis'97/ 177-9, Ploufragan, France.
- 62.-Hunt, G. L. Jr. (1972)- Influence of food distribution and human disturbance on the reproductive success of herring gulls. *Ecol.*, **53** (6) 1051-61.
63. -Isenmann, P. (1977)- L'essor démographique et spatial de la mouette rieuse (*Larus ridibundus*) en Europe. *Oiseau, Revue Française d' Ornithol.*, **47** (1) 25-40.
- 64.-ISO 6579 (1993)- Norme Internationale. Microbiologie: Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*, pp. 18.
- 65.-Jauniaux, J. T.; Brosens, L.; Farnir, F.; Manteca, C.; Losson, B.; Tavernier, J.; Vindevogel, H.; Coignoul, F. (1996)- Mortalité des oiseaux marins lors de l'hiver 1992-1993 le long du littoral belge. *Ann. Méd.Vet.*, **140**: 3:149-59
- 66.-Johnston, W. S.; Maclachlan, G. K. & Hopkins, G. F. (1979)- The possible involvement of seagulls (*Larus* sp.) in the transmission of salmonella in dairy cattle. *Vet. Rec.*, **105**: 526-27.
- 67.-Johnston, W. S.; Munro, D.; Reilly, W. J. & Sharp, J. C. M. (1981)- An unusual sequel to imported *Salmonella zanzibar*. *J. Hyg. (Camb.)*, **87**: 525-8.
- 68.-Joiris, C. (1978)- Le goeland argenté portugais (*Larus argentatus lusitanicus*), nouvelle forme de goéland argenté à pattes jaunes. *Aves*, **15** (1) 17-8.
- 69.-Jones, P. W.; Collins, P. & Hayle, A. J. (1984)- The effect of sodium sulphacetamide and sodium mandelate in brilliant green agar on the growth of salmonellas. *J. Appl. Bacteriol.*, **57**: 423-28.
- 70.-June, G. A.; Sherrod, P. S.; Hammack, T. S.; Amaguaña, M. R.& Andrews, W. H. (1995)- Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and

- Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh and other highly contaminated foods: Precollaborative study. *J. AOAC Intern.*, **78** (2) 375-80.
- 71.-June, G. A.; Sherrod, P.S.; Hammack, T. S.; Amaguaña, M. R.& Andrews, W. H. (1996) Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh, highly contaminated foods and poultry feed: Collaborative study. *J. AOAC Intern.*, **79** (6) 1307-23.
- 72.-Kalapothaki, V.; Trichopoulos, D.; Papadakis, J.; Mavrommati, C.& Vassiliadis, P. (1986)- A comparison of the efficiency of two forms of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium. *Intern. J. Food Microbiol.*, **3**: 89-97.
- 73.-Kamel, A. M.; El-Hamamy, M. M. & Khafagy, A. A. (1997)- Bacteriological and pathological studies on salmonellae in free-flying wild birds in faculty of veterinary medicine farm at Ismailia governorate. *Vet. Med. J. Giza*, **45** (3) 315-23.
- 74.-Kampelmacher, E. H. & Jansen, L. M. N. (1973)- *Salmonella* and *E.Coli* in the Rhine and Mause at their entrance in the Netherlands. *Zbl. Bact. Hyg. I. Orig.*, **158**: 177-82.
- 75.-Kapperud, G. & Rosef, O. (1983)- Avian Wildlife Reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **45** (2) 375-80.
- 76.-Karpisková, R.; Dedicova, D. & Srámová, H (1997)- Salmonellosis in the Czech Republic in 1995. *Salmonella and Salmonellosis '97/ 581-3*, Ploufragan, France.
- 77.-Keymer, I. F. (1958)- A survey and review of the causes of mortality in British birds and the significance of wild birds as disseminators of disease. *Vet. Rec.*, **70**: (36) 713-20.
- 78.-Kirkpatrick, C. E. & Trexler-Myren, V. P. (1986)- A survey of free-living falconiform birds for *Salmonella*. *J. Am. Vet. Assoc.*, **189** (9) 997-8.
- 79.-Knowles, S. O & Donaldson, W. E. (1997)- Lead disrupts eicosanoid metabolism, macrophage function, and disease resistance in birds. *Biol. Trace Elem. Res.*, **60** (1-2) 13-26.
- 80.-Le Minor, L. (1984). *Salmonella*, Lignières 1900. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Vol.I. 9^aEd. Williams e Wilkins, Baltimore, U.S.A, 408-58.
- 81.-Le Minor, L.; Veron, M. & Popoff, M. (1982)- Taxonomie des *Salmonella* . *Ann. Microbiol. (Paris)* **133B**: 223-243.
- 82.-Le Minor, L. & Popoff, M. (1987)- Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, **37** (4) 465-8.

- 83.-Lévesque, B.; Brousseau, P.; Simard, P.; Dewailly, E.; Meisels, M.; Ramsay, D.; Joly, J. (1993)- Impact of the Ring-Billed Gull (*Larus delawarensis*) on the Microbiological Quality of Recreational Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (4) 1228-30.
- 84.-Machado, J. & Pires, I. (1990) *Salmonella* identificadas no Instituto Nacional de Saúde entre 1984 e 1989. *Bolet. Epidemiol. I.N.S.A.*
- 85.-Minette, H. P. (1986)- Salmonellosis in the marine environment: a review and commentary. *Int. J. Zoon.*, **13**: 71-5.
- 86.- Mitscherlich, E. & Marth, E. H. (1984a)- *Microbial survival in the environment*. Springer-Verlag, Berlin, 330-429.
- 87.-Mitscherlich, E. & Marth, E. H. (1984b)- *Microbial survival in the environment*. Springer-Verlag, Berlin, 738-44.
- 88.-Moats, W. A. (1981)- Update on *Salmonella* in foods, selective plating media and other diagnostic media. *J. Food Protec.*, **44**: 375-80.
- 89.- Monaghan, P. & Coulson, J. C. (1977)- Status of large gulls nesting on buildings. *Bird Study*, **24**: 84-104.
- 90.-Monaghan, P. (1979)- Aspects of the breeding biology of herring gulls *Larus argentatus* in urban colonies. *Br. Ornithologists' Union*, 475-81.
- 91.-Monaghan, P. (1980)- Dominance and dispersal between feeding sites in the Herring Gull (*Larus argentatus*). *Anim. Behav.*, **28**: 521-27.
- 92.-Monaghan, P. (1983)- Gulls: populations and problems. In *Enjoying Ornithology*. Hichling, R. (ed). Poyser, 232-237.
- 93.-Monaghan, P., Shedden, C.B., Ensor, K., Fricker, C.R. & Girdwood, R.W.A.(1985) *Salmonella* carriage by herring gulls in the Clyde area of Scotland in relation to their feeding ecology. *J. Appl. Ecol.* **3** (22) 669-680.
- 94.-Monaghan, P. (1992)- Availability and exploitation of food resources: Introduction. *Ardea*. **80**: 41-3.
- 95.-Monfort, P.; Piclet, G.; Le Gal, D.; Raguénes, P.; Le Naour, G.; Boulben, S. & Le Saux, J. C. (1997)- Incidence de *Salmonella* spp. dans les bivalves des zones conchylicoles du Finistère (France). *Salmonella and Salmonellosis'97/* 431-3, Ploufragan, France.
- 96.-Monroe Jr., B. L. & Sibley, C. G. (1993)- *A world checklist of birds*. Yale University Press, 111-13.
- 97.-Morais, L. & Vicente, L. (1995)- Espectro alimentar de juvenis não voadores de *Larus cachinnans* da ilha da Berlenga (Poster). *Simpósio sobre ecologia alimentar de aves*. Faculdade de Ciências de Lisboa, 8 a 10 de Dezembro 1995,

- 98.-Morais, L.; Santos, C.; Vicente, L. (1998)- Population increase of Yellow-legged gulls *Larus cachinnans* breeding on Berlenga island (Portugal), 1974-1994. *Sula* **1** (12) 27-37.
- 99.-Moriñigo, M. A.; Borrego, J. J. & Romero, P. (1986)- Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **61**: 169-76.
- 100.-Nisbet, N. J.; Corrier, D. E.; Ricke, S. C.; Hume, M. E.; Byrd, J. A. & Deloach, J. R. (1996)- Maintenance of the biological efficacy in chicks of a cecal competitive exclusion culture against *Salmonella* by continuous flow fermentation. *J. Food Protec.*, **59**: 1279-83.
- 101.-Nogales, M.; Zonfrillo, B. & Monaghan, P. (1995)- Diets of adults and chick Herring gulls *Larus argentatus* on Ailsa-Craig, south-west Scotland. *Seabird*, **17**: 56-63.
- 102.-NP-1933 (1982)- Norma Portuguesa-Microbiologia alimentar: Regras gerais para a pesquisa de *Salmonella*. Comissão Técnica Portuguesa de Normalização de microbiologia alimentar, DGQ, Lisboa, Portugal, pp. 15.
- 103.-Nunes, M. C. B. (1990)- Contribuição para o estudo da contaminação bacteriana de moluscos bivalves do estuário do Tejo. Dissertação apresentada para acesso à categoria de Investigador Auxiliar do INIP. IPIMAR, Lisboa, Portugal, pp. 119.
- 104.-Olsen, B.; Jaenson, T. G. T. & Bergström, S. (1995)- Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infected ticks on migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 3082-7.
- 105.-Olsen, B.; Bergström, S.; McCafferty, D.J; Sellin, M. & Wistroem, J. (1996)- Salmonella enteritidis in Antarctica: Zoonosis in man or humanosis in penguins? *Lancet ii* **348**: 1319-20.
- 106.-Palmgren, H.; Sellin, M.; Bergström, S.; Olsen, B. (1997)- Enteropathogenic Bacteria in Migrating Birds Arriving in Sweden. *Scand. J. Infect.Dis.*, **29**: 565-8.
- 107.-Papadopoulou, C. & Xylouri, E. (1989)- An assessment of Rappaport-Vassiliadis medium based on growth kinetics. *J. Food Protec.*, **52** (4) 252-3.
- 108.-Pearson, P.H. (1968)- The feeding biology of sea-birds species breeding on the Farne Islands, Northumberland. *J. Anim. Ecol.*, **37**: 521-51.
- 109.-Perales, I. & Audicana, A. (1989)- Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of Salmonellae in meat products. *J. Food Protec.*, **52** (5) 316-9.
- 110.-Peterz, M.; Wiberg, C. & Norberg, P. (1989)- The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of salmonella in home-made and commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**: 523-8.

- 111.-Pons, J.M. (1992)- Effects of changes in the availability of human refuse on breeding parameters in a Herring gull *Larus argentatus* population in Brittany, France. *Ardea*, **80**: 143-50.
- 112.-Prescott, L. M.; Harley, J. P. & Klein, D. A. (1996)- *Microbiology*. 3ª edição. Wm.C.Brown Publishers, U.S.A, 426-30.
- 113.-Quessy, S. & Messier, S. (1992)- Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). *J. Wildl. Dis.*, **28** (4) 526-31.
- 114.-Reilly, W. J.; Forbes, G. I.; Paterson, G. M. & Sharp, J. C. M. (1981)- Human and animal salmonellosis in Scotland associated with environmental contamination 1973-1979. *Vet. Rec.*, **108**: 553-5.
- 115.-Rodeia, S. C.; Bernardo, F. M. A. & Brandão, F. S. (1994)- *Salmonella* em pombos urbanos: Aspectos noso-epidemiológicos. *Veterinária Técnica*, **4** (1) 38-44.
- 116.-Rodrigue, D. C.; Tauxe, R. V. & Rowe, B. (1990)- International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic. *Epidemiol. Infect.*, **105**: 21-27.
- 117.-Roszak, D. B.; Grimes, D. J.; Colwell R. R. (1983)- Viable but non culturable stage of *Salmonella* Enteritidis in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 334-8.
- 118.-Ruíz, J.; Núñez, M. L.; Díaz, J; Sempere, M. A.; Gómez, J & Usera, M. A. (1996a)- Comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 571-4.
- 119.-Ruíz, J.; Núñez, M. L.; Díaz, J; Lorente, I.; Pérez, J. & Gómez, J (1996b)- Comparison of five plating media for the isolation of *Salmonella* species from human stools. *J. Clin. Microbiol.*, **34** (3) 686-8.
- 120.-Sixl, W.; Karpísková, R.; Hubálek, Z.; Halouska, J.; Mikulásková, M. & Salava, J. (1997)- *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Cent. Eur. J. Publ. Hlth.*, **5** (1) 24-6
- 121.-Sol, D.; Arcos, J. M.; Senar, J. C. (1995)- The influence of refuse tips on the winter distribution of yellow-legged gulls *Larus cachinnans*. *Bird Study*, **42**: 216-21.
- 122.-Spaans, A. L. (1971)-On the feeding ecology of the Herring Gull *Larus argentatus* Pont. in the northern part of the Netherlands. *Ardea*, **59**: 73-138.
- 123.-Spence, J. B. & Westwood, A. (1978)- *Salmonella agona* infection in sheep. *Vet. Rec.*, **102**: 332-6.
- 124.-Taylor, R. J. & Burrows, M. R. (1971)- The survival of *E. Coli* and *Salmonella* dublin in slurry on pastures and the infectivity of *S. dublin* for grazing calves. *Brit. Vet. Bull.*, **127**: 536.

- 125.-Teixeira, A. M. (1981)- Contagem invernal de Larídeos e Phalacrocoracídeos no Estuário do Tejo e na Ria de Aveiro (Janeiro de 1981). CEMPA, Lisboa, Portugal.
- 126.-Thomason, B. M. ; Dodd, D. J. & Cherry, W. B. (1977)- Increased recovery of Salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34** (3) 270-3.
- 127.-Vassiliadis, P.; Paternaki, E.; Papaiconomou, N., Papadakis, J.A. & Trichopoulos, D. (1976)- Nouveau procédé d'enrichissement de Salmonella. *Ann. Microbiol. (Paris)*, **127B**: 195-200.
- 128.-Vassiliadis, P.; Trichopoulos, D.; Papoutsakis, G. & Pallandou, E. (1979)- A note on the comparison of two modifications of Rappaport's medium with selenite broth in the isolation of salmonellas. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**: 567-9.
- 129.-Vicente, L. A. (1987)- Observações ornitológicas na ilha da Berlenga, 1974-1985. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst.*, **7**: 17-36.
- 130.-Wall, P. G.; Ross, D.; Van Someren, P.; Ward, L. R.; Threlfall, J.; Rowe, B. (1997)- Features of the epidemiology of multidrug resistant Salmonella typhimurium DT 104 in England and Wales. *Salmonella and Salmonellosis '97* 565-7, Ploufragan, France.
- 131.-Watts, J. L.; Chengappa, M. M.; Cole, J. R.; Cooper, J. M.; Hoffman, L. J. *et al.* (1997)- Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Tentative standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, U.S.A, pp. 63.
- 132.-Williams, B. M.; Richards, P. W. & Lewis, J. (1976). *Salmonella* infection in the herring gull (*Larus argentatus*). *Vet. Rec.*, **98**: 51.
- 133.-Williams, B. M.; Richards, P. W.; Stephens, D.P. & Griffiths, T. (1977)- The transmission of *S. livingstone* to cattle by the herring gull (*Larus argentatus*). *Vet. Rec.*, **100**: 450-1.
- 134.-Wilson, W. W. & Matheson, R. C. (1952)- Bird migration and foot and mouth disease. *Vet. Rec.*, **64**: 541.
- 135.-Wilson, J. E. & MacDonald, J. W. (1967)- *Salmonella* infection in wild birds. *Brit. Vet. J.*, **123**: 212-8.
- 136.-Wood, R. L.; Pospischil, A. & Rose, R. (1989)- Distribution of persistent *Salm. Typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.*, **50** (7) 1015-21.
- 137.-Wray, C. (1975)- Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet. Bull.*, **45**, 543-8.

ANEXO
Lista de abreviações mencionadas

BSA	“Bismuth Sulphite Agar”
DT	Definitive type
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ISO	International Standard Organisation
NBGL	Novobiocin-Brilliant green glycerol lactose agar
NP	Norma Portuguesa
O.M.S	Organização Mundial de Saúde
ONPG	Ornitofenol-galactopiranosido
PT	Phage type
Ref.	Referência
Rep	República
SS agar	Salmonella Shigella agar