PATRICIA BRACONARO

Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura

SÃO PAULO

2012

Patricia Braconaro

Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Priscilla Anne Melville

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2629
FMVZ

Braconaro, Patricia

Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura / Patricia Braconaro. -- 2012.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Priscilla Anne Melville.

1. Passeriformes. 2. Microbiota. 3. Cloaca. 4. Escherichia coli.
5. Programas de soltura. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da microbiota intestinal bacteriana e fúngica em passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de relocação", protocolado sob o nº 2349/2011, utilizando 150 (cento e cinquenta) pássaros, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Priscilla Anne Melville, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Characterization of bacterial and fungal intestinal microbiota of confiscated wild passerines which will be submitted to relocation programs", protocol number 2349/2011, utilizing 150 (one hundred and fifty) birds, under the responsibility Profa. Dra. Priscilla Anne Melville, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRACONARO, Patricia.

Título: Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Dedico este trabalho aos meus pais,
Rosália Barros Braconaro, Darcio
Braconaro e ao meu irmão Fernando
Braconaro pelo amor incondicional e por
estarem comigo em todos os momentos
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família Darcio, Rosália e Fernando pelo amor, pela confiança, pelo carinho e torcida.

À minha orientadora Priscilla Anne Melville, pela confiança, paciência, dedicação, por todo o aprendizado, pelas risadas e ajuda nos momentos difíceis.

À minha amiga Eveline por toda ajuda e alegria dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do laboratório André e Sandra pelo carinho, pela ajuda e companheirismo, tornando o nosso trabalho agradável e descontraído

Ao professor Nilson pelo aprendizado, carinho e confiança

Às amigas do DEPAVE, Adriana Joppert, Thaís, Ticiane e Alice por contribuírem diretamente com este trabalho coletando e fornecendo as amostras, além da alegria, do bom humor, da paciência e flexibilidade sempre presentes.

Ao professor Paulo Eduardo Brandão, pela confiança quando me aceitou como estagiária, pela paciência e aprendizado,

Às amigas do Labmas, pelo carinho, pelos ensinamentos, ajuda e confiança, em especial as amigas: Thaísa, Giselle e Carol.

À Tia Selma e a prima Nicole pela ajuda, pela paciência, pelo amor e palavras de incentivo

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Elza, pela gentileza, paciência, atenção e tantos esclarecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de Mestrado.

Agradeço a Deus por mais esta oportunidade .

RESUMO

BRACONARO, P. Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura. [Characterization of bacterial and fungal microbiota present in the cloacae of confiscated wild passerines that will be submitted to release programs]. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atualmente muitas espécies nativas de pássaros são consideradas raras no Brasil, pois são capturadas de forma indiscriminada por traficantes de animais e são então comercializadas, fazendo com que sejam encontradas cada vez mais em menor quantidade em seus *habitats* naturais. Animais confiscados do tráfico têm sido submetidos a programas de soltura ou relocação, atentando-se para que os mesmos não representem risco à população nativa. Passeriformes silvestres, saudáveis ou doentes, podem carrear uma grande diversidade de micro-organismos e, portanto, o conhecimento sobre o *status* sanitário de animais apreendidos do tráfico que serão submetidos a programas de soltura, permite uma avaliação quanto à possibilidade destes animais atuarem como portadores de agentes patogênicos bem como atua como elemento esclarecedor da epidemiologia de doenças transmissíveis, aspecto fundamental para a preservação da saúde animal e também humana. O presente estudo procurou avaliar a ocorrência e frequência de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas bem como de fungos em suabes obtidos de cloacas de passeriformes silvestres apreendidos do tráfico e que serão submetidos a programas de soltura. Foram realizados testes de suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *E. coli* frente a diferentes antimicrobianos utilizando-se o método de disco difusão, bem como a pesquisa de diversos genes codificadores de fatores de virulência nos mesmos através reação em cadeia da polimerase. A maior parte dos passeriformes (62,5%) avaliados apresentou uma microbiota cloacal constituída por bactérias aeróbias e/ou anaeróbias facultativas e/ou fungos, sendo que os micro-organismos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus* spp. (15,0%), *Micrococcus* spp. (11,5%), *Escherichia coli* (10,7%) e *Klebsiella* spp. (10,7%).

Observou-se uma maior ocorrência de bactérias Gram positivas seguidas por bactérias Gram negativas e fungos. A frequência de bactérias Gram negativas (28,4% do total de amostras coletadas) foi bastante representativa. Foram isolados 14 gêneros de bactérias, 03 gêneros de leveduras e 04 de fungos filamentosos. As 27 estirpes de *E.coli* isoladas apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, sendo que ampiclina e amoxicilina+ácido clavulânico foram os antimicrobianos frente aos quais observou-se maior índice de resistência (100%) por parte dos isolados, enquanto que cloranfenicol foi o antimicrobiano frente ao qual observou-se maior índice de sensibilidade (100%). Somente um dos isolados de *E.coli* foi positivo para presença do gene codificador de fímbria S (*sfa*), podendo ser compatível com perfil de *E. coli* patogênica aviária (APEC) ou *E. coli* uropatogênica (UPEC). Nenhum dos isolados apresentou características condizentes com *E.coli* enteropatogênica (EPEC). Considerando-se a reduzida ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência estudados pode-se concluir que os passeriformes apreendidos do tráfico representam baixo risco potencial no tocante à transmissão de estirpes de EPECs, APECs e UPECs para outros animais ou mesmo para o ser humano. Por outro lado deve-se considerar o risco potencial de transmissão intra ou interespécies de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos bem como a introdução destes micro-organismos no ambiente. Os riscos de disseminação de *Salmonella* spp., *Cryptococcus* spp e *Candida* spp. são pouco prováveis quando considerados programas de soltura.

Palavras-chave: Passeriformes, Microbiota, Cloaca, *Escherichia coli*, Programas de soltura.

ABSTRACT

BRACONARO, P. Characterization of bacterial and fungal microbiota present in the cloacae of confiscated wild passerines that will be submitted to release programs. [Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura]. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Currently, many native bird species are considered rare in Brazil, once they are indiscriminately captured by animal traffickers and then are sold, which makes them increasingly found in smaller quantities in their natural habitats. Confiscated animals have been submitted to relocation programs attempting to ensure that they do not pose a risk to the native population. Wild passerines, healthy or sick, may carry a wide variety of microorganisms and therefore, knowledge on health status of confiscated animals which will be relocated, allows an assessment as to whether these animals act as carriers of pathogens to native populations as well as clarifies the epidemiology of diseases, which is fundamental to the preservation of animal and human health. This study aimed to investigate the occurrence and frequency of aerobic and facultative anaerobic bacteria and fungi in cloacal swabs of wild confiscated passerines which will be submitted to relocation programs. *In vitro* susceptibility testing of *E. coli* strains to different antimicrobials as well as an investigation of the presence of virulence genes in these isolates using the polymerase chain reaction were performed. Most of the animals investigated (62.5%) presented a cloacal microbiota composed by aerobic and/or facultative anaerobic bacteria and/or fungi. The microorganisms most frequently isolated were: *Staphylococcus* spp. (15.0%), *Micrococcus* spp. (11.5%), *Escherichia coli* (10.7%) and *Klebsiella* spp. (10.7%). The frequencies of isolations of Gram positive bacteria were higher ($P < 0.05$) than those of Gram negative and also higher ($P < 0.05$) than fungi. The frequencies of isolations of Gram negative bacteria (28.4% from the total of samples) were very representative. Fourteen genera of bacteria, 03 genera of yeasts and 04 of filamentous fungi were isolated. The occurrence of multidrug resistance was observed for 100% of the *E. coli*

isolates. All *E. coli* strains were resistant to ampicillin and amoxicillin plus clavulanic acid and were sensitive to chloramphenicol. One *E.coli* isolate was positive for the presence of the gene encoding S fimbriae (*sfa*), may be a strain profile compatible with UPEC or APEC. None of the *E. coli* isolates resembled EPEC. Considering the reduced occurrence of genes encoding virulence factors it was concluded that confiscated passerines represent low potential risk regarding the transmission of EPECs, APECs or UPECs strains to other animals or even humans. Furthermore, the potential risk of intra or interspecies transmission of *E. coli* multiresistant to antimicrobials must be considered as well as the introduction of these micro-organisms in the environment. The risks regarding dissemination of *Salmonella* spp., *Cryptococcus* spp and *Candida* spp. are unlikely when relocation programs are considered.

Keywords: Passerines, Microbiota, Cloacae, *Escherichia coli*, Release Programs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Relação das espécies de passeriformes avaliadas, a quantidade de aves de cada espécie e a porcentagem das mesmas em relação ao total de 253 aves - São Paulo-2012	30
Tabela 2– Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) de gêneros e espécies de micro-organismos (bactérias e fungos) a partir de suabes de cloacas de passeriformes, considerado o total de 253 amostras coletadas e também ao total de 158 amostras, nas quais houve o crescimento de micro-organismos - São Paulo-2012	40
Tabela 3– Resultados em número absoluto e porcentagem dos testes de suscetibilidade in vitro de 27 isolados de Escherichia coli obtidos de amostras de suabes cloacais de passeriformes frente a 23 antimicrobianos- São Paulo-2012.....	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1– Primers utilizados na PCR para amplificar fragmentos dos genes: pap, sfa, afa, hly, iuc, eae, bfb, cnf, tsh e iss	33
Gráfico 1– Resultado geral dos exames microbiológicos de suabes cloacais de passeriformes considerando ausência ou presença de crescimento bacteriano e/ou fúngico no total de 253 amostras- São Paulo-2012.....	37
Gráfico 2– Número absoluto e porcentagem de isolamentos de bactérias Gram -positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduriformes de suabes cloacais de passeriformes, considerando as 158 amostras positivas para o crescimento de micro-organismos- São Paulo-2012	38
Gráfico 3– Frequência de isolamentos de gêneros de micro-organismos (bactérias e fungos) a partir de suabes de cloaca de passeriformes, considerando um total de 253 amostras coletadas bem como o total de 158 amostras nas quais houve o crescimento fúngico e/ou bacteriano- São Paulo-2012	42
Gráfico 4–Resultados em número absoluto e porcentagem dos testes de suscetibilidade in vitro de 27 isolados de Escherichia coli obtidos de amostras de suabes cloacais de passeriformes frente a diferentes antimicrobianos São Paulo-2012.	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

% =	por cento
oC =	graus Celsius
® =	marca registrada
x g =	múltiplos da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
x =	vezes
AIDS=	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APEC=	Escherichia coli aviária
BHI =	Brain and heart infusion broth
DNA =	ácido desoxirribonucleico
EDTA =.....	ácido etileno-diamino-tetracético
EAEC=	Escherichia coli enteroagregativa
EIEC=	Escherichia coli enteroinvasora
EPEC=	Escherichia coli enteropatogênica
ETEC=.....	Escherichia coli enterotoxigênica
EHEC=	Escherichia coli enterohemorrágica
et al.=	e colaboradores
g =	força da gravidade
HCl=	ácido clorídrico

KCl = cloreto de potássio

MgCl₂ = cloreto de magnésio

µg = micrograma

µl = microlitro

µM= micromolar

µg/ml= micrograma por mililitro

mg/l= miligrama por litro

mM= milimol

NMEC=..... Escherichia coli causadora de meningite neonatal

pb = pares de bases

pH =..... potencial hidrogênionico

PCR = reação em cadeia da polimerase

pmoles= picomoles

STEC=..... Escherichia coli produtora de toxina tipo Shiga

Tris= hidroxemetil-aminometano

UPEC= Escherichia coli uropatogência

XLT4=..... xilose-lisina-tergitol 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Introdução aos Passeriformes	18
2.2	O Tráfico de Animais Silvestres no Brasil.....	18
2.3	Programas de soltura de aves silvestres	20
2.4	O papel dos passeriformes na epidemiologia das doenças infecciosas e zoonoses	21
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Coleta das amostras	29
4.2	Isolamento e identificação dos micro-organismos presentes nos suabes cloacais dos .passeriformes.....	31
4.3	Avaliação da suscetibilidade in vitro das estirpes de Escherichia coli isoladas frente a diferentes antimicrobianos	32
4.4	Pesquisa de fatores de virulência em estirpes de Escherichia coli isoladas das amostras utilizando a reação em cadeia da polimerase	32
4.4.1	Extração do DNA bacteriano.....	34
4.4.2	Reação em cadeia da polimerase para detecção dos fatores de virulência de Escherichia coli	34
4.4.3	Detecção do produto amplificado	34

4.5	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Isolamento e identificação dos micro-organismos presentes nos suabes cloacais dos passeriformes.....	36
5.2	Avaliação da suscetibilidade in vitro das estirpes de Escherichia coli isoladas frente a diferentes antimicrobianos	42
5.3	Pesquisa de fatores de virulência em estirpes de Escherichia coli isoladas das amostras utilizando a reação em cadeia da polimerase	44
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICES	67

1 INTRODUÇÃO

As aves despertam grande interesse por parte dos seres humanos devido à beleza de suas plumagens e seus cantos, sendo sempre cobiçadas como animais de estimação ou companhia em todo mundo, uma vez que são relativamente fáceis de criar.

Atualmente muitas espécies nativas de pássaros já são consideradas raras no Brasil, pois são capturadas de forma indiscriminada por grupos de tráfico de animais, sendo então comercializadas, o que faz com que sejam encontradas cada vez em menor quantidade em seus *habitats* naturais.

Passeriformes doentes ou saudáveis podem carrear agentes bacterianos, virais e fúngicos. Tendo em vista sua habilidade de voar livremente e, muitas vezes, percorrer longas distâncias, estes animais desempenham um importante papel na epidemiologia das doenças infecciosas e até mesmo na transmissão de micro-organismos resistentes a antimicrobianos.

Programas de soltura ou relocação (introdução, reintrodução, revigoramento ou translocação populacional) de animais confiscados do tráfico têm sido desenvolvidos e devem ser sempre estimulados com vistas à conservação das espécies. Entretanto, deve-se atentar para que os animais relocados não representem qualquer risco para a população original.

Assim sendo, no tocante aos programas de soltura, deve-se cuidar para que os animais relocados estejam livres de patógenos que possam ser transmitidos aos animais nativos da região de destino, o que poderia desta forma representar um risco à saúde destes animais e comprometer assim, o ideal da conservação. Desta forma, o conhecimento sobre a epidemiologia das doenças transmissíveis torna-se vital para preservar a saúde destes animais.

Neste sentido, estudos acerca do *status* sanitário de animais apreendidos do tráfico que serão relocados, como por exemplo, levantamentos sobre ocorrência e frequência de micro-organismos nas fezes de passeriformes silvestres, podem constituir importantes ferramentas de avaliação quanto à possibilidade destes animais atuarem como portadores de agentes patogênicos para outros animais, considerando que o contato intra e interespecies pode desempenhar um papel relevante na transmissão de doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Introdução à Ordem Passeriformes

Os passerídeos, também conhecidos como pássaros ou passarinhos, são as aves da ordem Passeriformes. A denominação pássaros deriva de *Passer domesticus*, nome científico da espécie-tipo pardal. Estes animais encontram-se divididos em duas subordens, Suboscines e Oscines diferenciadas, sobretudo por características morfológicas como a estrutura da siringe. Em geral são aves de pequenas dimensões, com alimentação baseada principalmente em sementes, frutos e pequenos invertebrados (GUIMARÃES, 2007).

A ordem Passeriformes é numerosa e diversificada, e compreende 5739 espécies em todo mundo, o que representa 59,1% do total de aves, sendo uma das mais diversificadas ordens de vertebrados do planeta. A América do Sul possui a mais rica avifauna do mundo, com mais de 2950 espécies, dentre residentes e visitantes. O Brasil, por sua vez, possui um número estimado em 1796 espécies, sendo 191 endêmicas, segundo o Ministério do Meio Ambiente (RIBEIRO; SILVA, 2007).

O Brasil possui uma das mais diversificadas faunas de aves do mundo, sendo Amazônia e Mata Atlântica os biomas com maior quantidade das mesmas, seguidas pela região do Cerrado, Caatinga e pelos campos da região sul do país (MARINI; GARCIA, 2005).

2.2 O tráfico de animais silvestres no Brasil

O tráfico de animais silvestres é considerado a terceira maior atividade ilícita, ficando atrás apenas do tráfico de armas e de drogas. Um dos principais motivos pelos quais esta atividade cresce no Brasil e no mundo é o fato do tráfico de drogas se tornar cada vez mais difícil devido aos recursos empregados para combatê-lo, enquanto o tráfico de animais oferece menor risco e lucro semelhante ao obtido com as drogas (RENCTAS, 2002). Justamente por ser uma atividade ilícita não há como precisar

números, mas acredita-se que esta atividade movimenta em nosso país cerca de 1,0 a 1,5 bilhões de dólares ao ano (RENCTAS, 2002).

No Brasil o tráfico de animais silvestres possui três finalidades distintas: para colecionadores particulares e zoológicos; para fins científicos (biopirataria), onde substâncias químicas produzidas pelos animais servem como base de pesquisa e produção de medicamentos; para abastecer pet shops, sendo esta atividade a que mais incentiva o tráfico no país (RENCTAS, 2001). Os passeriformes são as aves mais comuns criadas em gaiolas de todo o mundo, sendo que pelo menos dois milhões destas são comercializadas anualmente no mercado mundial. A maioria destas aves é originária de países africanos, enquanto no Brasil o tráfico de passeriformes é direcionado principalmente ao mercado interno (RENCTAS, 2001).

Apreensões do IBAMA em todo o Brasil, durante os anos de 1999 a 2000, revelaram que 82% dos animais comercializados naquela época eram aves, sendo os passeriformes a ordem com maior quantidade de apreensões (RIBEIRO; SILVA, 2007).

Segundo um levantamento efetuado pela SOSFAUNA (2012), no Brasil é possível comprar animais silvestres em muitos locais como feiras livres, *pet shops* e até mesmo através da internet, sendo que os animais mais comercializados (principalmente pela população de baixa renda) são: Galo-de-Campina, Azulão, Pixarro, Canário-da-Terra, Pássaro-Preto, Pintassilgo, Cardeal, Tico-Tico, Pixoxó, Sabiá-Laranjeira, Coleirinha, Bigodinho, Brejal, Chupim e Corrupião. Estima-se que cerca de 90% dos animais traficados morram antes de chegar ao seu destino final devido às condições inadequadas de manutenção dos mesmos desde a captura até o transporte. Há que se ressaltar ainda o papel do estresse como fator associado ao desenvolvimento de doenças nestes animais.

O grande risco associado ao tráfico de animais consiste na redução da abundância de determinadas populações, sendo que a captura excessiva é a segunda principal causa da redução populacional de várias espécies, perdendo apenas para a degradação e a redução dos *habitats* provocadas pelo desmatamento (RIBEIRO; SILVA, 2007). Ainda segundo estes autores, as consequências destas ações são as modificações dos ecossistemas nas estruturas das comunidades que, com suas populações reduzidas, podem não mais desempenhar suas funções ecológicas.

2.3 Programas de soltura de aves silvestres

O Brasil abriga cerca de 57% das espécies de aves registradas na América do Sul, sendo que mais de 10% dessas espécies são endêmicas, demonstrando a importância de programas de conservação no país (MARINI; GARCIA, 2005).

Aves confiscadas do tráfico têm sido submetidas à programas de soltura ou relocação, que consistem na introdução, reintrodução, revigoramento ou translocação populacional de espécies no ambiente, atentando-se para que as mesmas não representem risco para a população nativa (IUCN, 2002).

Existem poucos programas de relocação bem planejados, sendo que a soltura de aves confiscadas pelas autoridades muitas vezes é realizada em locais distantes da distribuição geográfica natural destes animais e sem uma avaliação apropriada do estado sanitário dos mesmos sendo, portanto, pouco conhecidas as consequências da soltura (MARINI; GARCIA, 2005).

Visando solucionar os problemas relacionados a maus tratos e abusos aos animais silvestres, bem como a soltura indiscriminada, a introdução de espécies exóticas e problemas ambientais e sanitários, o IBAMA criou a Instrução Normativa 179 (IN-179) em 25/06/2008 com o objetivo de definir procedimentos para a destinação dos animais da fauna silvestre apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente às autoridades. Através desta normativa são estabelecidos critérios para soltura dos animais na natureza, como por exemplo, a realização de exames em animais confiscados antes de serem submetidos à relocação, com o objetivo de prevenir a introdução de patógenos no ambiente, bem como garantir a sobrevivência tanto dos animais relocados quanto dos nativos (IBAMA, 2008).

Segundo a normativa IN-179 os animais somente poderão retornar imediatamente ao seu *habitat* natural nos casos em que forem recém-capturados da natureza, havendo comprovação do local de onde foram retirados, bem como do fato dos mesmos ocorrerem naturalmente no local da captura, e também não apresentarem problemas que impeçam a sobrevivência ou adaptação em vida livre.

Os animais apenas serão encaminhados para programas de soltura com a finalidade de reintrodução à natureza, reforço populacional ou experimentação que tenha como objetivo o desenvolvimento de programas de soltura. As aves encaminhadas para estes programas devem ser submetidas a uma quarentena de no

mínimo trinta dias, anamnese, identificação, elaboração de ficha clínica e realização de exames laboratoriais (IBAMA, 2008).

Para fins de programas de soltura devem ser realizados exames microbiológicos para pesquisa de *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Clamidia* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., vírus da Doença de NewCastle e vírus da Influenza (IBAMA, 2008).

No tocante aos passeriformes, em apreensões que envolvam de 20 a 100 aves, devem ser realizados exames de no mínimo 20% dos animais e em apreensões de acima de 101 animais, deve-se examinar pelo menos 10% do lote (IBAMA, 2008).

FILHO (2002) fez algumas recomendações para solucionar ou minimizar o problema deste tipo de tráfico que incluem: incrementar a estruturação do IBAMA em relação a recursos materiais bem como aumentar a quantidade de funcionários com remuneração adequada; criação de um centro de pesquisa para crimes ambientais; incremento da fiscalização nos principais portos e aeroportos do país; realização de estudos que avaliem formas de se evitar o comércio de animais pela internet; implementação de programas de geração de renda para comunidades carentes que hoje estão envolvidas no comércio ilegal de animais; criação de campanhas educativas para a população visando alertar para os danos advindos da aquisição de animais silvestres bem como conscientizar para o fato de que estes animais podem carrear doenças e transmiti-las à população.

2.4 O papel dos Passeriformes na epidemiologia de doenças infecciosas e zoonoses

O contínuo crescimento populacional humano associado com aumento das áreas habitadas, desenvolvimento da agricultura, diminuição de áreas verdes, promovem maior contato com aves silvestres, seja pela caça, pelo desmatamento ou pelo tráfico destes animais. Isto também aproxima agentes infecciosos, permitindo que estes patógenos encontrem novos ambientes e hospedeiros (SIMBIEDA et al., 2011).

As aves podem transmitir doenças aos seres humanos, aos animais domésticos e aos animais nativos da região de destino quando considerados programas de soltura. Assim sendo, o conhecimento sobre a epidemiologia das doenças transmissíveis torna-

se vital para preservar a saúde humana e animal (CORRÊA; PASSOS, 2001). Morishita et al. (1999) afirmaram ser importante determinar as doenças potenciais que podem ser transmitidas por aves como os passeriformes, pois elas podem atuar como fonte de infecção para outros animais e até para a população humana. Segundo Hubálek (2004), passeriformes silvestres saudáveis ou doentes podem carrear uma grande diversidade de micro-organismos dentre bactérias, vírus e fungos.

O isolamento e identificação dos micro-organismos presentes no animal e a avaliação do risco que podem vir a representar para si próprios, para o ser humano e outros animais, têm grande importância, pois podem auxiliar na redução da possibilidade de surgimento de doenças, bem como podem contribuir para fins de conservação animal (GOMES, 2002).

Os passeriformes podem ser acometidos por diversas doenças bacterianas ou fúngicas tais como salmonelose, colibacilose, pseudotuberculose, estafilococose, estreptococose, tuberculose, candidíase e aspergilose (GUIMARÃES, 2007).

As infecções gastrointestinais mais comuns em passeriformes são causadas por *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp.. *E. coli* e outras enterobactérias não são normalmente encontradas no trato gastrointestinal de passeriformes saudáveis, porém são isoladas nas fezes ou conteúdo intestinal de animais doentes com ou sem diarreia. Por sua vez, *Staphylococcus* e *Streptococcus* podem ser normalmente encontrados em passeriformes e estão associados a doenças como dermatites, conjutivites, sinusites, artrites e pneumonias (DORRESTEIN, 2009).

De acordo com a IN-179, deve-se proceder ao exame laboratorial para pesquisa de alguns micro-organismos dentre os quais *Salmonella* sp., *Cryptococcus neoformans* e *Candida* sp. para avaliação das condições da ave apreendida do comércio ilegal para sua inclusão em programas de soltura.

Vários sorotipos de *Salmonella* spp. são capazes de infectar a maior parte dos vertebrados, no entanto, a suscetibilidade do hospedeiro e o desenvolvimento de um estado portador podem variar amplamente entre espécies. *Salmonella* spp. podem infectar passeriformes silvestres causando doença e muitas vezes o óbito do animal, ou então se disseminar a partir de seus hospedeiros e infectar animais domésticos e o ser humano. Embora tida como doença aviária por mais de cem anos, a salmonelose tem sido reconhecida como uma doença emergente, tendo em vista que sua prevalência em populações de passeriformes silvestres tem aumentado consideravelmente nos últimos quarenta anos, possivelmente como consequência da alimentação artificial

fornecida pelos humanos. A salmonelose ocorre mais comumente nos passeriformes que recebem alimento diretamente no chão ou em local passível de contaminação fecal (TIZARD, 2004).

Salmonella spp. podem ser adquiridas através do contato com outros animais (especialmente roedores e outras aves), verticalmente através da transmissão por ovos ou quando os pais alimentam os filhotes, e como contaminante do ambiente (McCLUGGAGE, 1996; TIZARD, 2004).

Pennycott; Park e Mather . (2006) isolaram diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* a partir de amostras de fígado e intestino delgado colhidas em exames *pós-morte* de passeriformes selvagens como *Carduelis chloris*, *Passer domesticus*, *Fringilla coelebs* e *Carduelis carduelis* na Grã-Bretanha. Refsum et al. (2002) realizaram avaliações *pós-morte* em diferentes órgãos de diversas espécies de aves e isolaram *Salmonella* spp. em 441 passeriformes.

Salmonella spp. isoladas de amostras coletadas de aves de estimação, geralmente não são consideradas patógenos importantes para humanos saudáveis podendo, entretanto, acarretar problemas graves em crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas (DORRESTEIN, 1997). Alley et al. (2002), por sua vez, relataram a ocorrência de um surto de salmonelose associada a *S. Typhimurium*, que causou grande mortalidade em passeriformes e teria se disseminado para humanos causando quadros de enterite nos mesmos na Nova Zelândia no ano de 2000.

Daniels et al. (2003) sugeriram com base em um modelo experimental, que a ingestão de alimento contaminado por fezes de animais silvestres como os passeriformes, pode contribuir para a ocorrência de doenças como a salmonelose em animais domésticos e de criação.

Por sua vez, leveduras como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. são causas comuns de doenças no homem e animais, e estão frequentemente associadas a quadros de imunossupressão (SANTOS et al., 2009). Em pássaros acometem principalmente o trato respiratório e gastrointestinal (SANTOS et al., 2009).

Candida spp. fazem parte da microbiota dos seres humanos, mas podem tornar-se patogênicas causando doenças que acometem pele, olhos, trato gastrointestinal, cavidade oral e sistema circulatório (ROSSI et al., 2012). Das infecções hospitalares adquiridas por pacientes ou profissionais da área da saúde, a candidíase é a principal doença de natureza fúngica, sendo uma preocupação mundial, considerando-se ainda a frequente resistência a agente antifúngicos deste micro-organismo (MALUCHE;

SANTOS, 2008). Em aves a candidíase pode estar associada a lesões principalmente na cavidade oral, esôfago, ingluvío e proventrículo (SANTOS et al., 2009).

Por sua vez, a criptococose é a doença fúngica sistêmica de maior prevalência mundial, que acomete pessoas com a imunidade comprometida, principalmente portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), afetando os sistemas neurológico e respiratório (SANTOS et al., 2009). Nos animais esta doença possui menor incidência, acometendo principalmente gatos, enquanto que em aves é uma doença rara, de difícil diagnóstico *ante-mortem*, pois apresenta sintomatologia inespecífica como fraqueza, perda de peso, diarreia, dispnéia e depressão (SANTOS et al., 2009).

Existem diversas espécies de *Cryptococcus* sendo que, em geral, as que estão envolvidas em infecções são *C. neoformans* e *C. gattii*. O contágio ocorre através da inalação de aerossóis presentes no ambiente, principalmente no solo e excretas de aves contaminadas (HEDAYATI et al., 2011). Vários estudos relatam a ocorrência de *C. neoformans* em excretas de aves, principalmente pombos domésticos, sendo esta a principal forma de contaminação ambiental (CARFACHIA et al., 2011).

No tocante à *Escherichia coli*, embora não esteja incluída dentre os micro-organismos a serem pesquisados de acordo com a IN-179, trata-se de um importante agente que pode causar relevantes doenças intestinais ou extraintestinais como infecções urinárias, meningite e septicemia (ORSKOV, 1985; PEETERS, 1994; NATARO; KAPER, 1998; BOPP, 1999). As linhagens patogênicas de *E. coli* podem, portanto, ser classificadas em amostras que causam infecção intestinal (*E. coli* diarréiogênicas) e outras que estão associadas a infecções extraintestinais (*E. coli* patogênica extraintestinal) como infecções urinárias, meningites, dentre outras (KAPER et al., 2004).

As técnicas de biologia molecular permitem a detecção de genes codificadores de diferentes fatores de virulência de *E. coli* e assim possibilitam a classificação em patotipos como *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* produtora de toxina tipo Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal (NMEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC) (SAYLERS; WHITT, 1994; KAPER et al., 2004).

As diferentes manifestações clínicas das colibaciloses estão associadas a diferentes propriedades de virulência que constituem mecanismos que incrementam a capacidade da bactéria em causar doença. Os fatores de virulência são codificados por genes cromossômicos e elementos genéticos extracromossômicos (ex. bacteriófagos e ilhas genômicas) e constituem componentes estruturais, fatores envolvidos com a colonização como adesinas e sideróforos, além de outros fatores como a produção de enterotoxinas, citotoxinas, colicinas, fator necrosante citotóxico (*cnf*), intiminas, hemolisinas, fator de resistência aos antimicrobianos, dentre outros (SUSSMAN, 1997).

Um dos principais mecanismos envolvidos na patogênese de EPEC é a formação de lesões *attaching and effacing* (A/E), caracterizadas pela ligação íntima da bactéria com a membrana do enterócito ocorrendo desaparecimento das microvilosidades intestinais do mesmo e formação de estruturas semelhantes a pedestais sobre os quais EPEC se adere de maneira íntima. Esta habilidade de produzir lesões do tipo A/E também foi detectada em amostras de *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC). A produção destes tipos de lesões A/E está relacionada à presença da proteína intimina (BLANCO et al., 2006). A intimina é uma proteína localizada na membrana externa da bactéria, codificada pelo gene *eae*, responsável pela aderência íntima às células hospedeiras, que desencadeia a lesão *attaching and effacing* (A/E) (BLANCO et al., 2006). As amostras de EPEC são classificadas em EPEC típica e EPEC atípica, as quais diferem pelos sorotipos (combinações entre antígenos O e H) e presença de fímbria tipo IV BFP (*bundle-forming pilus*) e do plasmídeo EAF (EPEC *Adherence Factor*), os quais são observados somente nas EPECs típicas (TRABULSI et al., 2002).

As UPECs constituem o principal agente etiológico das infecções do trato urinário. Os principais fatores de virulência das UPECs são representados pelas adesinas que podem ser fimbriais (como as fímbrias P e S) ou afimbriais. A fímbria P (*pyelonephritis-associated pilus*) é codificada pelo gene *pap* e a fímbria S pelo gene *sfa*. Podem também estar presentes as adesinas afimbriais manose-resistentes capazes de mediar ligações específicas com a célula uroepitelial, sendo codificadas pelo gene *afa* (DONNEMBERG; WELCH, 1996). As UPECs também podem produzir toxinas como a hemolisina (gene *hly*), uma proteína citolítica formadora de poros, e também o fator citotóxico necrosante (gene *cnf*) o qual é capaz de induzir o rearranjo dos microfilamentos de actina nas células eucarióticas (BOQUET, 2001; GENTSCHEV et al., 2002). Além disso, as UPECs podem ser capazes de produzir sistemas de

captação de ferro como os sideróforos aerobactina (codificados pelo gene *iuc*) que são secretados pela bactéria em casos de baixa disponibilidade de ferro (JOHNSON, 1997).

As estirpes de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) estão associadas a diversas doenças, principalmente extraintestinais - salpingite, colisepticemia, doenças respiratórias, peritonite, celulite, dentre outras - sendo responsável por grandes perdas na indústria aviária (BARNES et al., 2001). Entretanto, em aves silvestres APEC frequentemente está associada a afecções entéricas (FIENNES, 1982). Estudos apontaram para a existência de uma relação entre APEC e *E. coli* associadas a infecções extraintestinais (*Extraintestinal pathogenic E. coli*), principalmente UPECs e *Escherichia coli* causadoras de meningite neonatal (NMEC), sugerindo que algumas APECs poderiam apresentar potencial zoonótico (EWERS et al., 2007; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). De fato, as APECs podem apresentar fatores de virulência também observados nas UPECs, tais como fímbrias S e P, aerobactina e hemolisina. Além destes fatores, APECs podem apresentar uma hemaglutinina sensível à temperatura (*temperature sensitive hemagglutinin* - codificada pelo gene *tsh*), assim como uma proteína com atividade proteolítica e de adesão (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004) e também a capacidade de resistência a componentes séricos pelo fator *Iss* (*increased serum survival* – codificado pelo gene *iss*) (JOHNSON et al., 2002).

Por sua vez, a resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido um problema crescente no tocante às doenças animais e humanas. Este assunto frequentemente instiga um debate sobre a teoria de que, a exposição aos antimicrobianos exerceria pressão de seleção para bactérias resistentes às drogas, aumentando desta forma a quantidade de bactérias multirresistentes encontradas na clínica veterinária e humana (GIBBS et al., 2007). Assim sendo, o exame de populações de aves que não são frequentemente expostas aos antimicrobianos poderia auxiliar na compreensão deste assunto.

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos geralmente é utilizado para bactérias de importância clínica, porém ele também se mostra útil na comparação de isolados em estudos epidemiológicos, pois quando a pressão seletiva aos antibióticos se altera, as linhagens bacterianas também podem se modificar (FARMER, 1999).

O presente estudo procurou avaliar a ocorrência e frequência de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas bem como de fungos em suabes cloacais de passeriformes silvestres apreendidos do tráfico que serão submetidos a programas de soltura, em vista da escassez de pesquisas realizadas nesta área, bem como procurou investigar a possibilidade destes animais atuarem como portadores de micro-organismos patogênicos para o homem e outros animais, particularmente no tocante à ocorrência de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, pois procedeu-se à caracterização molecular através da pesquisa de fatores de virulência nas estirpes isoladas, visando uma melhor compreensão da epidemiologia das doenças e do caráter zoonótico das mesmas, bem como para auxiliar na implementação de ações de manejo mais efetivas e para aprimorar formas de vigilância voltadas para estes animais.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- ✓ Investigar as microbiotas bacteriana (bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas) e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de soltura;
- ✓ Avaliar a suscetibilidade *in vitro* das estirpes de *Escherichia coli* isoladas destes animais frente aos antimicrobianos;
- ✓ Pesquisar fatores de virulência associados às *E. coli* enteropatogênicas (EPECs), *E. coli* uropatogênicas (UPECs) e *E. coli* patogênicas aviárias (APECs)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

Foram avaliados 253 passeriformes apreendidos do tráfico e encaminhados ao DEPAVE (Departamento de Parques e Áreas Verdes de São Paulo-Divisão de Medicina Veterinária). As amostras foram coletadas através de suabes cloacais dos passeriformes. Os suabes foram acondicionados em meio de transporte de Stuart e encaminhados sob refrigeração ao laboratório.

Foram coletados suabes de 253 passeriformes de 34 espécies distintas: 58 Pixarros (*Saltator simillis*); 36 Canários-da-Terra (*Sicalis flaveola*); 28 Galos-de-Campina (*Paroaria dominicana*); 23 Coleirinhos-Paulista (*Sporophila caerulescens*); 17 Azulões (*Cyanoloxia brissoni*); 12 Pássaros-Preto (*Gnorimopsar chopi*); 12 Pixoxós (*Sporophila frontalis*); 10 Sabiás-Laranjeira (*Turdus rufiventris*); 7 Sanhaços Cinzento (*Thraupis sayaca*); 6 Tico-Tico (*Zonotrichia capensis*); 5 Cigarrinhas Verdadeira (*Sporophila falcirostris*); 4 Corrupiões (*Icterus jamacaii*); 3 *Sporophila* sp.; 3 Pintassilgos (*Sporagra magellanica*); 2 Brejal (*Sporophila albogularis*); 2 Coleiros-Baiano (*Sporophila nigricolis*); 2 Curiós (*Sporophila angolensis*); 2 Pintagol; 2 Sabiás-Barranco (*Turdus leucomelas*); 2 Sabiás-Poca (*Turdus amaurochalinus*); 2 Tico-Tico-Rei-Cinza (*Lanio Pileatus*); 2 Tiês-Preto (*Tachyphonus coronatus*); 2 Tzius (*Volatinia jacarina*); 1 Sabiá-Coleira (*Turdus albicollis*), 1 Bico-de-Pimenta (*Saltatricula atricollis*); 1 Caboclinho (*Sporophila bouvreuil*); 1 Cais-Cais (*Euphonia chalybea*); 1 Encontro (*Icterus pyrrhopterus*); 1 Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*); 1 Sabiá-Una (*Turdus flavipes*); 1 Saí-Azul (*Dacnis cayana*); e 1 Sanhaço-de-Encontro-Amarelo (*Tangara ornata*), 1 Bigodinho (*Sporophila lineola*); 1 Cardeal (*Paroaria coronata*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação das espécies de passeriformes avaliadas, a quantidades de aves de cada espécie e as porcentagens das mesmas em relação ao total de 253 aves - São Paulo - 2012

Nome científico	Nome popular	Quantidade de aves	% em relação ao total de aves
<i>Saltator similis</i>	Pixarro	58	22,9
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-Terra	36	14,2
<i>Paroaria dominicana</i>	Galo de Campina	28	11,1
<i>Sporophila caerulea</i>	Coleirinho Paulista	23	9,1
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	17	6,7
<i>Gnorimopsar chopi</i>	Passaro Preto	12	4,7
<i>Sporophila frontalis</i>	Pixoxó	12	4,7
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabia Laranjeira	10	4
<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaço Cinzento	7	2,8
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico Tico	6	2,4
<i>Sporophila falcirostris</i>	Cigarrinha Verdadeira	5	2
<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	4	1,6
<i>Sporophila</i> sp.	<i>Sporophila</i> sp.	3	1,2
<i>Sporagra magellanica</i>	Pintassilgo	3	1,2
<i>Sporophila albogularis</i>	Brejal	2	0,8
<i>Sporophila nigricollis</i>	Coleiro Baiano	2	0,8
<i>Sporophila angolensis</i>	Curió	2	0,8
Pintagol.....	Pintagol*	2	0,8
<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá Barranco	2	0,8
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá Poca	2	0,8
<i>Lanio pileatus</i>	Tico Tico Rei Cinza	2	0,8
<i>Tachyphonus coronatus</i>	Tiê Preto	2	0,8
<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziu	2	0,8
<i>Tangara ornata</i>	Sanhaço de Encontro Amarelo	1	0,4
<i>Turdus flavipes</i>	Sabiá-Una	1	0,4
<i>Dacnis cayana</i>	Saí Azul	1	0,4
<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá Coleira	1	0,4
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Garibaldi	1	0,4
<i>Icterus pyrrhopterus</i>	Encontro	1	0,4
<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal	1	0,4
<i>Sporophila bouvreuil</i>	Caboclinho	1	0,4
<i>Euphonia chalybea</i>	Cais-cais	1	0,4
<i>Saltatricula atricollis</i>	Bico de Pimenta	1	0,4
<i>Sporophila lineola</i>	Bigodinho	1	0,4
Total		253	100,2

* Cruzamento entre Pintassilgo e Canária

4.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos presentes nos suabes cloacais dos passeriformes

Visando a pesquisa de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, os suabes foram inicialmente inoculados em caldo BHI (*Brain and heart infusion broth*) com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras também foram semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, com incubação em aerobiose a 37°C com leituras em 24-96 horas. As amostras cultivadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, com incubação destas realizada de forma similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

Visando a pesquisa de *Salmonella* spp., os suabes foram inoculados em caldo tetratonato incubado a 37°C por 24 horas. Paralelamente as amostras também foram semeadas em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (XLT4), com incubação em aerobiose a 37°C com leituras a 24-96 horas. Após a incubação, as amostras inoculadas em caldo tetratonato, foram semeadas em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (XLT4) com incubação destas realizada de forma similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

Visando a pesquisa de fungos filamentosos e leveduras, foi realizado o cultivo das amostras em caldo Sabouraud-dextrose e ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol (100 mg/l) com incubação a 25°C por um período de 3 dias para o caldo e de 7 dias para o ágar que foi submetido a avaliações diárias. Após incubação de três dias, as amostras cultivadas em caldo Sabouraud-dextrose foram semeadas em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol (100 mg/l), com incubação destas realizada de forma similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com características macro e microscópicas bem como por provas bioquímicas conforme descrito por Farmer (1999). Os fungos filamentosos e leveduras isolados foram identificados de acordo com características macro e microscópicas, bem como por provas fisiológicas, de acordo com Barnett et al. (2000) e Hunter e Hunter (1998).

Em casos nos quais houve dúvida, foram utilizados os sistemas de identificação RapID® (Remel).

4.3 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* das estirpes de *Escherichia coli* isoladas frente a diferentes antimicrobianos.

Foram realizados testes de suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *E. coli* frente a diferentes antimicrobianos, a saber: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), amoxicilina+ácido clavulânico (10µg), aztreonam (30µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefepime (30µg), ceftiofur (30µg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), netilmicina (30µg), norfloxacina (10µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25µg), tetraciclina (30µg) e tobramicina (10µg).

Os testes foram realizados em meio de Muller & Hinton, empregando-se o método de disco difusão, segundo técnica de Bauer et al. (1966). A interpretação dos testes foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do micro-organismo. As concentrações, bem como o critério de interpretação, foram os recomendados pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008).

4.4 Pesquisa de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas das amostras utilizando a reação em cadeia da polimerase

Foi realizada pesquisa de fatores de virulência em 27 estirpes de *E.coli* isoladas através de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Foram utilizados diferentes pares de oligonucleotídeos comercialmente disponíveis para detectar os genes que codificam para intimina (*eae*), fímbria tipo IV BFP (*bfp*), pili associados com pielonefrite (*pap*), alfa-hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*), fator citotóxico necrosante (*cnf*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*) e fator Iss (*iss*). O tamanho dos amplicons e literatura relevante são apresentadas no quadro 1.

Quadro 1- *Primers* utilizados na PCR para amplificar fragmentos dos genes: *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *iuc*, *eae*, *bfp*, *cnf*, *tsh* e *iss*

Genes codificadores	Nome do primer	Sequência do oligonucleotídeo (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (bp)	Referência
<i>pap</i>	<i>pap</i> -1 <i>pap</i> -2	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto et al. (1995)
<i>hly</i>	<i>hly</i> -1 <i>hly</i> -2	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Yamamoto et al. (1995)
<i>iuc</i>	<i>aer</i> -1 <i>aer</i> -2	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	Yamamoto et al. (1995)
<i>cnf</i>	<i>cnf</i> -1 <i>cnf</i> -2	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498	Yamamoto et al. (1995)
<i>sfa</i>	<i>sfa</i> -1 <i>sfa</i> -2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Yamamoto et al. (1995)
<i>afa</i>	<i>afa</i> -1 <i>afa</i> -2	GCTGGGCAGCAAACTGATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTTCGTCGCCG	750	Yamamoto et al. (1995)
<i>eae</i>	<i>eae</i> -1 <i>eae</i> -2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CGAGACGATACGATCCAG	917	Aranda et al. (2007)
<i>bfp</i>	<i>bfp</i> -1 <i>bfp</i> -2	GATTGAATCTGCAATGGTGC GGATTACTGTCCTCACATAT	570	Wieler et al. (1996)
<i>iss</i>	<i>iss</i> -1 <i>iss</i> -2	ATCACATAGGATTCTGCCG CAGCGGAGTATAGATGCCA	309	Ewers et al. (2005)
<i>tsh</i>	<i>tsh</i> -1 <i>tsh</i> -2	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTTCCGATGTTCTGAACGT	824	Ewers et al. (2005)

4.4.1 Extração do DNA bacteriano

Para a obtenção do material genético foi utilizado o método de extração por choque térmico (ZHANG et al., 2007). Foi realizada uma suspensão de colônia isolada em 500 µL de tampão Tris-EDTA pH 8.0, a qual foi incubada por 15 minutos em banho seco a 100°C. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo por 15 minutos, período após o qual foram centrifugadas por 12000 x *g* durante um minuto. O sobrenadante foi retirado para realização da PCR. A cada extração realizada utilizou-se como controle positivo uma amostra de *Escherichia coli* positiva para os fatores de virulência avaliados.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos fatores de virulência de *Escherichia coli*

Para detecção dos fatores de virulência em estirpes de *E.coli* foram utilizados os *primers* e protocolos de reação descritos por Aranda et al. (2007); Yamamoto et al. (1995); Wieler et al. (1996) e Ewers et al. (2005).

A solução para amplificação foi composta por 40 pmoles de cada primer, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µl.

A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo com genes positivos para os fatores mencionados no quadro 1, bem como um controle negativo.

4.4.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (10 µg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen, California).

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Fischer, empregando-se o *software* GRAPHPAD INSTAT 1992-98 para realização dos mesmos.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação dos micro-organismos presentes nos suabes cloacais dos passeriformes

De um total de 253 amostras de suabes de cloaca de passeriformes, houve crescimento de micro-organismos em 62,5% das amostras (N=158), sendo as demais 37,5% (N=95) negativas para presença dos mesmos, diferença esta estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Em relação ao total de amostras (N=253), foram isoladas bactérias em 60,8% (N=154) - sendo 37,9% de Gram positivas e 28,4% de Gram negativas - e fungos (leveduriformes e/ou filamentosos) em 13,8% (N=35).

Considerando-se as 253 amostras, em 48,6% (N=123) houve somente crescimento bacteriano, em 1,6% (N=4) apenas crescimento fúngico (leveduriformes e/ou filamentosos), em 12,3% (N=31) houve o crescimento de fungos e também bactérias (Gráfico 1).

Do total de 158 amostras nas quais houve crescimento de micro-organismos foram isoladas bactérias Gram positivas e Gram negativas em, respectivamente, 60,7% (N=96) e 45,5% (N=72) das amostras, diferença esta estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Por sua vez, leveduras e fungos filamentosos foram isolados em, respectivamente, 10,1% (N=16) e 13,3% (N=21) das amostras positivas (Gráfico 2) (Apêndice A).

Gráfico 1 - Resultado geral dos exames microbiológicos de suabes cloacais de passeriformes considerando ausência ou presença de crescimento bacteriano e/ou fúngico no total de 253 amostras- São Paulo - 2012

Gráfico 2 - Número absoluto e porcentagem de isolamentos de bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos e leveduriformes de suabes cloacais de passeriformes, considerando as 158 amostras positivas para crescimento de micro-organismos - São Paulo - 2012

Foram isolados 14 gêneros de bactérias (*Acinetobacter* spp.; *Bacillus* spp.; *Citrobacter* spp.; *Edwardsiella* spp.; *Enterobacter* spp.; *Enterococcus* spp.; *Escherichia* sp.; *Klebsiella* spp.; *Micrococcus* spp.; *Pasteurella* spp.; *Proteus* spp.; *Serratia* spp.; *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.), 3 gêneros de leveduras (*Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Trischosporon* spp.) e 4 gêneros de fungos filamentosos (*Aspergillus* spp.; *Cladosporium* spp.; *Penicillium* spp. e *Mucor* spp.). (Tabela 2 e Gráfico 3).

Os gêneros de micro-organismos de maior ocorrência ($P < 0,05$) foram: *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia* sp. e *Klebsiella* spp. (Tabela 2 e Gráfico 3).

Observou-se ocorrência de *Staphylococcus* spp. em 38 amostras (15%) (considerando-se o total de 253), sendo que em uma destas, houve crescimento de mais de uma espécie. Foram isoladas 14 espécies distintas de *Staphylococcus* (*S. arlettae*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. kloosii*, *S. psifermentans*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *S. xylosus*). *Micrococcus* spp. foram isolados em 29 amostras (11,5%) (Tabela 2).

Klebsiella spp. foram isoladas em 27 amostras (10,7%), sendo que em quatro destas houve o crescimento de mais de uma espécie/subespécie. Foram isoladas as espécies *K. pneumoniae* (subespécies *ozaenae*, *pneumoniae* e *rhinoscleromatis*) e *K. oxytoca*. *Escherichia coli* também foi isolada em 27 amostras (10,7%), seguida por *Bacillus* spp. (N=21 ou 8,3%), *Streptococcus* spp. (N=14 ou 5,5%) de cinco espécies diferentes (*S. avium*, *S. alactolyticus*, *S. dysgalactiae*, *S. mitior* e *S. mutans*), *Candida* spp. (N=13 ou 5,1%) de cinco espécies (*C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lambica* e *C. tropicalis*), *Enterobacter* spp. (N=10 ou 4,0%) de duas espécies diferentes (*E. aerogenes* e *E. cloacae*), *Penicillium* spp. (N=8 ou 3,2%) e *Citrobacter* spp. (N=7 ou 2,8%) de três espécies distintas (*C. amalonaticus*, *C. diversus* e *C. freundii*). Foram isolados em frequências inferiores, espécies de *Enterococcus* spp. (*E. avium* e *E. faecium*), *Acinetobacter* spp., *Edwardsiella* spp. (*E. hoshinae* e *E. tarda* biogrupo I), *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Serratia marcescens*, *Trichosporon* spp., *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis* e *Rhodotorula* spp. (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) de gêneros e espécies de micro-organismos (bactérias e fungos) a partir de suabes de cloaca de passeriformes, considerando o total de 253 amostras coletadas e também o total de 158 amostras nas quais houve o crescimento de micro-organismos - São Paulo - 2012

(Continua)

Relação de gêneros e espécies de bactérias e fungos isolados	Número de cepas isoladas	% em relação ao total de amostras (N=253)	% em relação as amostras positivas (N=158)
<i>Staphylococcus</i> spp.	38	15	24,1
<i>Micrococcus</i> spp.	29	11,5	18,4
<i>Klebsiella</i> spp.	27	10,7	17,1
<i>Escherichia coli</i>	27	10,7	17,1
<i>Bacillus</i> spp.	21	8,3	13,3
<i>Streptococcus</i> spp.	14	5,5	8,9
<i>Candida</i> spp.	13	5,1	8,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	11	4,3	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	11	4,3	7
<i>Enterobacter</i> spp.	10	4	6,3
<i>Staphylococcus kloosii</i>	9	3,6	5,7
<i>Penicillium</i> spp.	8	3,2	5,1
<i>Citrobacter</i> spp.	7	2,8	4,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	2,8	4,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	2,8	4,4
<i>Streptococcus avium</i>	6	2,4	3,8
<i>Staphylococcus simulans</i>	6	2,4	3,8
<i>Candida tropicalis</i>	5	2	3,2
<i>Enterococcus</i> spp.	5	2	3,2
<i>Streptococcus mutans</i>	5	2	3,2
<i>Mucor</i> spp.	4	1,6	2,5
<i>Aspergillus</i> spp.	4	1,6	2,5
<i>Cladosporium</i> spp.	4	1,6	2,5
<i>Acinetobacter</i> spp.	4	1,6	2,5
<i>Enterococcus avium</i>	4	1,6	2,5
<i>Edwardsiella</i> spp.	4	1,6	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1,2	1,9
<i>Staphylococcus</i> sp.	3	1,2	1,9
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3	1,2	1,9
<i>Staphylococcus hominis</i>	3	1,2	1,9
<i>Candida famata</i>	3	1,2	1,9
<i>Citrobacter diversus</i>	3	1,2	1,9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1,2	1,9
<i>Edwardsiella tarda</i> biogrupo I	3	1,2	1,9

Tabela 2 - Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) de gêneros e espécies de micro-organismos (bactérias e fungos) a partir de suabes de cloaca de passeriformes, considerando o total de 253 amostras coletadas e também o total de 158 amostras nas quais houve o crescimento de micro-organismos (bactérias e/ou fungos) - São Paulo-2012

(Conclusão)

Relação de gêneros e espécies de bactérias e fungos isolados	Número de cepas isoladas	% em relação ao total de amostras (N=253)	% em relação as amostras positivas (N=158)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	2	0,8	1,3
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2	0,8	1,3
<i>Staphylococcus xylosum</i>	2	0,8	1,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0,8	1,3
<i>Candida guilliermondii</i>	2	0,8	1,3
<i>Candida albicans</i>	2	0,8	1,3
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,8	1,3
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	0,8	1,3
<i>Serratia marscescens</i>	2	0,8	1,3
<i>Trichosporum beigelli</i>	2	0,8	1,3
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1	0,4	0,6
<i>Streptococcus mitior</i>	1	0,4	0,6
<i>Streptococcus dysgalactae</i>	1	0,4	0,6
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,4	0,6
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,4	0,6
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,4	0,6
<i>Edwardisella hoshinae</i>	1	0,4	0,6
<i>Candida lambica</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus psifermentans</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus arlettae</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,4	0,6
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1	0,4	0,6
<i>Rhodotorulla</i> sp.	1	0,4	0,6

Gráfico 3 -. Frequência de isolamentos de gêneros de micro-organismos (bactérias e fungos) a partir de suabes de cloacas de passeriformes, considerando um total de 253 amostras coletadas bem como o total de 158 amostras nas quais houve o crescimento fúngico e/ou bacteriano- São Paulo - 2012

5.2 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* das estirpes de *Escherichia coli* isoladas frente a diferentes antimicrobianos

O maior índice de resistência (100%) foi observado frente à amoxicilina+ ácido clavulânico e também frente à ampicilina, seguidos por cefalotina e cefuroxima (ambos com resistência por parte de 92,6% dos isolados), tobramicina (88,9%) e ceftazidima (81,5%). Cloranfenicol foi o único antimicrobiano frente o qual observou-se sensibilidade por parte de 100% das estirpes avaliadas, seguido por norfloxacin (92,6%) e enrofloxacin (88,9%) (Tabela 3 e Gráfico 4).

Todos os isolados de *E. coli* foram multirresistentes, sendo que as 27 estirpes apresentaram resistência a pelo menos 07 dos 23 antimicrobianos testados (Apêndice B).

Tabela 3 - Resultados em número absoluto e porcentagem dos testes de suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras de suabes cloacais de passeriformes, frente a 23 antimicrobianos - São Paulo-2012

Antimicrobiano	Resistente		Intermediário		Sensível	
	N	%	N	%	N	%
Ampicilina	27	100,0	0	0,0	0	0,0
Amoxicilina + ácido clavulânico	27	100,0	0	0,0	0	0,0
Cefalotina	25	92,6	0	0,0	2	7,4
Cefuroxima	25	92,6	2	7,4	0	0,0
Tobramicina	24	88,9	1	3,7	2	7,4
Ceftazidima	22	81,5	0	0,0	5	18,5
Amicacina	17	63,0	1	3,7	9	33,3
Cefoxitina	17	63,0	3	11,1	7	25,9
Cefepime	13	48,1	0	0,0	14	51,9
Gentamicina	12	44,4	5	18,5	10	37,0
Netilmicina	12	44,4	7	25,9	8	29,6
Cefalexina	11	40,7	1	3,7	15	55,6
Ceftriaxona	8	29,6	7	25,9	12	44,4
Aztreonam	7	25,9	2	7,4	18	66,7
Cefotaxima	6	22,2	2	7,4	19	70,4
Neomicina	5	18,5	10	37,0	12	44,4
Ceftiofur	4	14,8	7	25,9	16	59,3
Enrofloxacina	3	11,1	0	0,0	24	88,9
Tetraciclina	3	11,1	3	11,1	21	77,8
Sulfametoxazol + trimetoprim	2	7,4	5	18,5	20	74,1
Ciprofloxacina	2	7,4	6	22,2	19	70,4
Norfloxacina	1	3,7	1	3,7	25	92,6
Cloranfenicol	0	0,0	0	0,0	27	100,0

Gráfico 4 - Resultados em porcentagem dos testes de suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras de suabes cloacais de passeriformes frente a diferentes antimicrobianos - São Paulo - 2012

5.3 Pesquisa de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas das amostras utilizando a reação em cadeia da polimerase

Somente uma amostra de um total de 27 estirpes de *E. coli*, foi positiva para o gene codificador de fímbria S (*sfa*), sendo negativa para os demais fatores pesquisados. Todos os demais isolados foram negativos para os fatores de virulência avaliados (*sfa*, *pap*, *iuc*, *cnf*, *hly*, *afa*, *eae*, *tsh*, *iss*, *bfp*).

6 DISCUSSÃO

O Brasil possui uma das mais ricas avifaunas do mundo, com aproximadamente 1700 espécies de aves distribuídas em seu território e cerca de 160 milhões de indivíduos, exercendo crescente pressão sobre os ecossistemas naturais e, conseqüentemente, influenciando a fauna e flora do país (GODOY et al., 2010).

Atualmente são inúmeras as causas de redução da biodiversidade, podendo-se considerar principalmente a perda de *habitat*, além de outros fatores como caça, comércio ilegal de animais e plantas e introdução de fauna e flora exótica (CATÃO-DIAS, 2008).

As aves, principalmente da ordem Passeriformes, são as mais afetadas pelo comércio ilegal (GODOY et al., 2010). O Brasil, país que representa uma importante fonte de animais para o tráfico, constitui um dos maiores exportadores de exemplares para o mundo inteiro (RENCTAS, 2001).

O aumento populacional humano, a redução de matas e áreas verdes, bem como escassez de fontes de alimentos, estimularam o contato entre animais silvestres, homem e animais domésticos. O homem tem contato com animais silvestres e os micro-organismos a eles associados principalmente através do comércio destes animais e da caça. O interesse crescente, bem como os avanços no tocante à conservação da vida selvagem, também têm criado oportunidades para o contato direto entre humanos e animais silvestres (SIMBIEDA et al., 2011).

As aves silvestres podem constituir importantes fontes de micro-organismos associados a zoonoses e podem estar associadas ao aumento de doenças infecciosas emergentes. As zoonoses entéricas são as mais frequentes, pois os micro-organismos associados a estes quadros podem ser facilmente transmitidos por via fecal-oral e também pelo contato direto das pessoas que manipulam as aves. A criação de passeriformes pelo homem e o contato deste com estas aves através do comércio ilegal de animais, tende a potencializar o risco de ocorrência de zoonoses (SIMBIEDA et al., 2011).

Os patógenos que podem ser transmitidos por aves silvestres têm sido uma preocupação crescente para a saúde pública, tendo-se como exemplo, o vírus da Influenza aviária (H5N1). A transmissão de doenças pode ser classificada como direta se o patógeno for transmitido ao homem através de contato direto com o animal e de

forma indireta, quando ocorre através de agentes carreadores como mosquitos, carrapatos, água contaminada por fezes, dentre outros. No caso de transmissão direta, a única doença que foi confirmada foi a gripe aviária em pacientes que entraram em contato direto com cisnes. Entretanto foram referidas 58 doenças de transmissão indireta causadas por bactérias, vírus e fungos. Dentre as doenças bacterianas, são importantes aquelas associadas à *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. e, dentre as doenças fúngicas, deve-se ressaltar as causadas por *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Trichophyton* spp., *Aspergillus* spp. e *Microsporum* spp. Embora haja o risco de transmissão, há poucos dados científicos que comprovem a mesma, ou seja, embora haja muita especulação sobre a transmissão de doenças destes animais para os humanos, há uma carência de dados científicos que comprovem estas teorias. Existe a necessidade da realização de estudos mais abrangentes envolvendo rotas das aves migratórias, testes moleculares de patogênese, avaliação da prevalência das doenças, dentre outros aspectos, para que se possa obter uma melhor compreensão acerca da dinâmica da transmissão de doenças, inclusive para prevenção de futuros surtos de doenças relevantes (TSIODRAS et al., 2008).

Por sua vez, as doenças bacterianas que acometem passeriformes estão relacionadas a problemas referentes à habitação, nutrição e/ou estresse. Os passeriformes muitas vezes são mantidos em cativeiro, e até mesmo em grandes quantidades de animais. A criação de uma espécie ou de várias espécies em conjunto, permite a disseminação das doenças infecciosas. Fatores nutricionais, superlotação e introdução de novas aves podem constituir fatores estressantes e desempenhar um papel relevante na ocorrência de surtos de doenças. *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., podem causar infecção primária ou secundária em passeriformes (JOSEPH, 2003). As infecções gastrointestinais mais comuns nestes animais são causadas por *E. coli* e outras enterobactérias como *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas* spp.. As enterobactérias não são normalmente encontradas no trato gastrointestinal de passeriformes saudáveis, porém são isoladas nas fezes ou conteúdo intestinal de animais doentes com ou sem diarreia (DORRESTEIN, 2009). Infecções por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus* spp. são observadas com frequência, sendo que os sinais clínicos podem variar e incluem abscessos, dermatites, pododermatites, artrites, sinusites, conjuntivites, onfalites e morte embrionária (JOSEPH, 2003).

Existem poucos estudos que tratam do isolamento de micro-organismos de passeriformes. Brittingham; Temple e Duncan (1988) relataram o isolamento principalmente de bactérias Gram positivas (34,9%) e cerca de 5% de Gram negativas a partir de exames microbiológicos de suabes cloacais de 364 passeriformes silvestres saudáveis, tendo observado ainda a ocorrência de 59,6% de resultados negativos. No presente estudo foram isolados micro-organismos em 62,5% (N=158) das 253 amostras avaliadas, tendo sido observada uma maior ocorrência ($P < 0,05$) de bactérias Gram positivas (37,9%) em relação às Gram negativas (28,4%). Os resultados de ambos os estudos concordam quanto a uma maior ocorrência de bactérias Gram positivas em relação às Gram negativas, mas são divergentes quanto às frequências de ocorrência das Gram negativas, devendo-se ressaltar o fato de que no presente estudo, tratam-se de passeriformes silvestres apreendidos do tráfico e, portanto, submetidos, na maior parte das vezes, à condições extremas sob diversos pontos de vista (higiene, alimentação, superlotação, etc.), condições estas que podem ter contribuído para a composição da microbiota observada, particularmente no que diz respeito ao elevado índice de isolamentos de bactérias Gram negativas, normalmente não encontradas no trato gastrointestinal de passeriformes saudáveis. Segundo Saidenberg e Knobl (2005), existem bactérias Gram positivas nas fezes de passeriformes granívoros e frugívoros, sendo que as Gram negativas não pertencem à microbiota intestinal, embora possam estar presentes em passeriformes granívoros apenas em época reprodutiva, período em que se alimentam de insetos

Os gêneros de micro-organismos de maior ocorrência ($P < 0,05$) foram *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia* sp. e *Klebsiella* spp. (Tabela 2 e Gráfico 3). Foram identificados 14 gêneros bacterianos a saber: *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Edwardsiella* spp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Micrococcus* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.. Todos estes micro-organismos apresentam interesse para a saúde pública e animal, tendo em vista que estão envolvidos em diversas patologias em seres humanos, aves e outros animais.

No presente estudo o micro-organismo mais frequentemente isolado a partir de suabes cloacais de passeriformes foi *Staphylococcus* spp. (15,0% das amostras), tendo sido isoladas 14 espécies distintas (*Staphylococcus arlettae*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. kloosii*, *S. piscifermentans*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *S. xylois*). Brittingham;

Temple e Duncan (1988) isolaram *Staphylococcus* spp. a partir de 15% das 364 amostras de suabes cloacais de passeriformes silvestres, mesma frequência de ocorrência observada no presente estudo. As bactérias do gênero *Staphylococcus* são comensais na pele de seres humanos e animais e são encontradas em mucosas no trato respiratório, urogenital e trato digestivo (FISCHETTI et al., 2006). Em passeriformes, estes micro-organismos estão relacionados principalmente a dermatites, sinusites, artrites e pneumonias (DORRESTEIN, 2009).

Micrococcus spp. foram isolados em 11,5% das amostras. Os membros do gênero *Micrococcus* são encontrados no meio ambiente e como componentes da microbiota transitória na pele de humanos e vários outros mamíferos. São micro-organismos que ocasionalmente estão associados à ocorrência de infecções em humanos, como por exemplo, endocardites, pneumonias e artrites, geralmente em pacientes imunossuprimidos (OUDIZ et al., 2004). Entretanto, não foram encontradas referências que associem este agente com aves.

As bactérias do gênero *Klebsiella* sp. juntamente com *Escherichia coli* despontaram em terceiro lugar quanto à ocorrência (10,7% das amostras). Duas espécies de *Klebsiella* foram isoladas: *K. pneumoniae* (subespécies *ozanae*, *pneumoniae* e *rhinoscleromatis*) em 9,4% das amostras e *K. oxytoca* em 2,8% das amostras.

Foti et al. (2011) estudaram os micro-organismos Gram negativos carregados por aves migratórias na região da Sicília (Itália), através do cultivo de suabes fecais de 218 pássaros de vida livre (a maioria passeriformes), tendo isolado 183 estirpes bacterianas dentre as quais: *Enterobacter* spp. (N=73 ou 39,89%), *Escherichia coli* (N=53, ou 28,9%), *Klebsiella* spp. (N=9 ou 4,91%), *Citrobacter* spp. (N=8 ou 4,37%), dentre outros agentes em menor percentagem. Todos estes gêneros bacterianos isolados por Foti et al. (2011), também foram isolados no presente estudo.

Godoy et al. (2010) avaliaram as causas de óbito em 360 passeriformes de 23 diferentes espécies, apreendidos do comércio ilegal destes animais, e detectaram um animal que apresentou pneumonia causada por *Klebsiella* sp.

Glunder et al. (1980) isolaram bactérias da família enterobacteriaceae em 17,3% (N=17 animais) das 98 amostras de fezes de passeriformes granívoros (10 espécies distintas). *Klebsiella pneumoniae* (3%) e *Enterobacter cloacae* (5%) foram as espécies de maior ocorrência. Os autores concluíram que, em tendo sido observada uma baixa ocorrência de enterobactérias, as mesmas não deveriam fazer parte da microbiota

intestinal, sendo então considerados agentes infecciosos secundários ou associados a condições de estresse nestes animais. No presente estudo *K. pneumoniae* e *E. cloacae* foram isoladas em, respectivamente, 9,4% e 2,8% das amostras.

No presente estudo *Escherichia coli* foi isolada em 10,7% das amostras. Morishita et al. (1999) realizaram pesquisa de *E. coli* em suabes cloacais de 1709 passeriformes de vida livre e obtiveram o isolamento do agente em 17,1% das amostras (293/1709). Glunder et al. (1980), por sua vez, isolaram 2% de *E. coli* a partir de 98 amostras de fezes de passeriformes. Brittingham; Temple e Duncan (1988) obtiveram isolamento de *E. coli* em somente 1% (em uma única ave *Poecile atricapillus*) das amostras de suabes cloacais de um total de 364 passeriformes e acreditam que a presença de *E. coli* poderia estar associada ao fato de que o isolamento do micro-organismo ocorreu a partir de um animal que habitava uma região próxima à presença de equinos, onde as aves eram vistas se alimentando de sementes presentes nos dejetos destes animais

Godoy et al. (2010) relataram que, dentre as causas de origem bacteriana de óbito de passeriformes apreendidos do comércio ilegal, 50% ocorreram devido a septicemias causadas por *E. coli*. Por sua vez Sanches (2008) ao realizar exames microbiológicos em diferentes órgãos obtidos de necrópsias de 86 passeriformes apreendidos na cidade de São Paulo oriundos do tráfico, isolou *E. coli* em sete destas amostras, sendo apenas uma estirpe isolada do intestino delgado.

Segundo Fiennes (1982), em aves exóticas e silvestres granívoras e frugívoras, *E.coli* é uma das causas mais frequentes de afecções entéricas.

Saidenberg e Knobl (2005) referem que *E. coli* faz parte da microbiota de muitos mamíferos e algumas espécies de aves. As infecções bacterianas por este agente podem ser primárias ou secundárias, geralmente atuando como oportunistas associados a problemas higiênico-sanitários, nutrição inadequada ou doenças concomitantes. Além disso, afirmam que *E. coli* é a espécie isolada com maior frequência em necrópsias de aves silvestres.

Hughes et al. (2009) avaliaram a ocorrência de genes codificadores (*stx1*, *stx2* e *eae*) de fatores de virulência (toxinas Shiga e intimina) em estirpes de *E. coli* em populações de aves silvestres. Foram coletadas amostras de fezes de 2084 aves silvestres sendo que *E. coli* foi isolada em 50,8% das amostras. A prevalência dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foi de 1,5%, 7,9% e 4,9%, respectivamente. Em 0,4% das amostras foram detectados, concomitantemente, os genes *eae* e *stx1* e em 0,2% foram

detectados *eae* e *stx2*. Oh et al. (2011), por sua vez, realizaram pesquisa do gene codificador de intimina (*eae*) em estirpes de *E. coli* isoladas de suabes cloacais de passeriformes silvestres saudáveis. Trinta e uma (3,92%) estirpes de *E. coli* isoladas de um total de 790, foram positivas para a presença do gene *eae* e, portanto, caracterizadas como EPECs. Os autores concluíram que *E. coli eae*-positivas podem ser carregadas por passeriformes silvestres os quais, por este motivo, podem representar potenciais riscos para a saúde animal e humana. No presente estudo, nenhum dos isolados foi positivo para o gene *eae*.

No presente estudo, por sua vez, foram pesquisados genes codificadores de diferentes fatores de virulência como intimina (*eae*), fímbria tipo IV BFP (*bfp*), pili associados com pielonefrite (*pap*), alfa-hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*), fator citotóxico necrosante (*cnf*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*) e fator Iss (*iss*) em 27 estirpes de *E. coli*, sendo que foi detectado somente o gene codificador de fímbria S (*sfa*) em um único isolado, podendo ser uma estirpe compatível com perfil de UPEC ou APEC. Considerando-se a reduzida ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência estudados pode-se concluir que os passeriformes apreendidos do tráfico representam baixo risco potencial no tocante à transmissão de estirpes de EPECs, APECs e UPECs para outros animais ou mesmo para o ser humano.

Salmonella spp. não foram isoladas a partir de nenhuma das amostras no presente estudo. Brittingham; Temple e Duncan (1988) e também Glunder et al. (1980) obtiveram o mesmo resultado ao pesquisar, respectivamente, 364 suabes cloacais e 98 amostras de fezes de passeriformes. Da mesma forma, Palmgren et al. (1997) investigaram a ocorrência de *Salmonella* spp. nas fezes de 101 passeriformes da Suécia, sendo que todas as amostras foram negativas para a presença da mesma.

Morishita et al. (1999), por sua vez, isolaram *Salmonella* spp. em 3,8% (66/1709) das amostras de suabes cloacais de passeriformes de vida livre. Refsum et al. (2003) ao avaliar aspectos patológicos e epidemiológicos da infecção por *Salmonella* Typhimurium em passeriformes da Noruega, obtiveram isolamento deste micro-organismo em 2% dos suabes cloacais realizados de um total de 1990 amostras. Segundo estes autores, os hábitos alimentares podem influenciar na contaminação, pois aqueles animais que recebem o alimento em comedouros artificiais, principalmente em locais onde o manejo em termos de higiene não é adequado, estão mais propensos a se contaminar quando comparados aos animais que procuram o

alimento e se alimentam em outros locais. Assim sendo, os autores concluíram que aqueles animais podem constituir uma fonte importante de infecção, podendo disseminar o agente para outros passeriformes.

Kirk et al. (2002), por sua vez, para determinarem a ocorrência de *Salmonella* spp. em aves na Califórnia, capturaram 809 passeriformes de vida livre e após eutanasiar estes animais, realizaram a cultura do conteúdo gastrointestinal isolando *Salmonella* spp. em 2,6% (N=21) das amostras e concluindo que, devido à baixa ocorrência do micro-organismo nestes animais, eles não seriam um reservatório importante para a salmonelose.

Godoy et al. (2010) ao avaliar a causa de óbito de 360 passeriformes apreendidos do tráfico, verificaram que para nenhuma destas aves a causa da morte teria sido infecção por *Salmonella* spp. Por sua vez, Hall e Saito (2008), ao estudar a frequência de óbitos por salmonelose em aves silvestres, observaram que a Ordem Passeriformes foi a que apresentou maior índice de ocorrência, sendo a causa de morte de 21,5% dos passeriformes envolvidos neste estudo. Embora *Salmonella* spp. estejam relacionadas à ocorrência de infecções bacterianas em passeriformes, a frequência das mesmas é baixa nestes animais (TIZARD, 2004). Este mesmo autor relata que são observadas grandes diferenças com relação à prevalência deste micro-organismo em amostras obtidas de passeriformes saudáveis quando comparada com aves mortas ou doentes. Como exemplo Tizard et al. (1979) isolaram *Salmonella* Typhimurium em 15% de aves saudáveis, enquanto Woebeser e Finlayson (1969) isolaram, na mesma região geográfica na qual Tizard; Fish e Harmeson (1979) realizaram suas pesquisas, o mesmo agente a partir de 90% das aves em exames de necrópsia realizados. O papel dos alimentadores de pássaros merece atenção especial, pois estes atraem um grande número de animais e podem permitir o acúmulo de matéria orgânica contaminada. Surtos de salmonelose podem ocorrer principalmente no inverno, período em que a alimentação natural torna-se escassa. Para amenizar o problema deve-se colocar menor quantidade de alimento nos alimentadores para restringir o acesso de grande quantidade de pássaros e estes alimentadores devem ser higienizados sempre que possível, minimizando a possibilidade de contaminação fecal (TIZARD, 2004).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno bastante importante, considerado problema de saúde pública e animal, decorrente principalmente do uso indiscriminado que culmina com o aparecimento de bactérias

multirresistentes. Este fenômeno também ocorre com aves silvestres sendo que, mesmo aquelas que nunca foram tratadas com antimicrobianos, apresentam em sua microbiota bactérias multirresistentes (GUENTHER et al., 2010). Este fenômeno possivelmente está relacionado ao contato destas aves com pessoas e animais domésticos ou então, ao contato com antibióticos naturais produzidos por micro-organismos no ambiente, podendo-se considerar ainda a possibilidade de contaminação ambiental com bactérias multirresistentes. As aves e outros animais podem ser colonizados por estas bactérias mesmo sem nunca terem estado em contato com agentes antimicrobianos (GUENTHER, 2010).

No presente trabalho, as 27 estirpes de *E.coli* isoladas apresentaram multirresistência, ou seja, todas se apresentaram resistentes à pelo menos 07 do total de 23 antimicrobianos testados, fenômeno este bastante importante sob o ponto de vista epidemiológico. Deve-se considerar o risco potencial de transmissão intra ou interespécies de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos bem como a introdução destes micro-organismos no ambiente.

Os maiores índices de resistência (100% das estirpes) foram observados frente à ampicilina bem como à amoxicilina+ácido clavulânico, seguidos por cefalotina (92,6%), cefuroxima (92,6%), tobramicina (88,9%) e ceftazidima (81,5%). Por outro lado, os maiores índices de sensibilidade foram obtidos frente ao cloranfenicol (100% das estirpes isoladas), norfloxacin (92,6%), enrofloxacin (88,9%) e tetraciclina (77,8%).

Guenther et al. (2010) avaliaram a suscetibilidade a diferentes antimicrobianos (ampicilina, cefalotina, neomicina, estreptomicina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina) de 187 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de suabes cloacais (160) e outros órgãos (06 amostras em coração, 09 de fígado, 13 de pulmão, 06 de baço e 07 de rins) de aves silvestres européias. A Ordem Passeriformes representou 62,5% das aves envolvidas neste estudo. Foram consideradas cepas multirresistentes aquelas que apresentaram resistência a três ou mais antibióticos, sendo assim classificadas 15 estirpes de *E. coli*. Assim sendo, de forma similar ao observado no presente estudo, os autores em questão detectaram a ocorrência de aves portadoras de estirpes de *E. coli* multirresistentes. Além disso, Guenther et al. (2010) observaram ocorrência de resistência por parte de 60% das estirpes testadas (9/15) frente a ampicilina, 46,6% (7/15) frente a cefalotina bem como tetraciclina, 33,3% (5/15) para neomicina, 26,6% (4/15) para cloranfenicol e 13,3% (2/15) para gentamicina. De forma similar, no

presente trabalho ampicilina foi o antimicrobiano frente o qual foi observado maior índice de resistência (100%), seguido por cefalotina com 92,6% de resistência. Cloranfenicol despontou dentre os antimicrobianos que apresentaram menor índice de resistência, o mesmo tendo sido observado no presente estudo onde 100% das estirpes apresentaram sensibilidade ao mesmo.

Foti et al. (2011) avaliaram os perfis de sensibilidade frente aos antimicrobianos dos micro-organismos isolados de suabes fecais de pássaros de vida livre. Embora os autores não tenham especificado os resultados referentes a *E. coli*, observaram que os maiores índices de sensibilidade apresentados pelas 183 cepas de *Enterobacteriaceae* avaliadas estavam associados a: sulfametoxazol+trimetoprim (99,4% das estirpes), cefotaxima (98,9%), cloranfenicol (95,6%) e tetraciclina (93,4%). No presente estudo foram observados índices de sensibilidade superiores a 70% frente a estes mesmos antimicrobianos (74,1% das estirpes para sulfametoxazol/trimetoprim; 70,4% para cefotaxima, 100% para cloranfenicol e 77,8% para tetraciclina). Por outro lado, Foti et al. (2011) verificaram que ampicilina foi um dos antimicrobianos para os quais observou-se maior índice de resistência (56,3%), ao passo que 100% das estirpes isoladas no presente trabalho também apresentaram resistência à mesma.

Gopee et al. (2000) realizaram testes de suscetibilidade *in vitro* frente a 296 estirpes de *E. coli* isoladas de aves de cativeiro em Trinidad e verificaram que os maiores índices de resistência foram observados frente à cefalotina (100%) e ampicilina (66,7%), resultados similares aos obtidos no presente estudo embora em proporções distintas (92,6% para cefalotina e 100% para a ampicilina). Estes autores observaram também que 21% das amostras apresentaram resistência tanto à cefalotina quanto à ampicilina sendo que, no presente trabalho, 92,6% dos isolados também apresentaram resistência a ambos os antimicrobianos.

Gibbs et al. (2007) pesquisaram os perfis de resistência antimicrobiana de membros da Família *Enterobacteriaceae* isolados a partir das fezes de pássaros-pretos (*Xanthocephalus xanthocephalus*) no estado da Dakota do Norte. Isolaram 33 cepas bacterianas dentre as quais *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.. Deste total, 33,3% não apresentaram resistência a nenhum antimicrobiano, sendo que os maiores índices de resistência foram observados frente à ampicilina (60,6%) e à cefalotina (33,33%), assim como observado no presente estudo.

Segundo Joseph (2003), a maioria das doenças fúngicas em aves estão relacionadas a manejo inadequado ou a quadros de imunossupressão causados por diversos fatores como desnutrição e doenças concomitantes.

As leveduras e fungos filamentosos isolados das amostras no presente estudo, tais como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., e *Mucor* spp., são descritos como agentes amplamente disseminados no ambiente. Foram isolados fungos a partir de 13,8% do total de 253 amostras. A presença de leveduras e fungos filamentosos foi observada em, respectivamente, 10,1% e 13,3% das amostras em que houve o crescimento de micro-organismos (N=158), sendo que apenas uma destas amostras apresentou mais de um gênero e/ou espécie de fungo.

Sabe-se que as leveduras fazem parte da microbiota gastrointestinal de aves, especialmente *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* spp., com variações de ocorrência de acordo com a espécie estudada (BRILHANTE et al., 2010). Três destes gêneros foram isolados no presente estudo: *Candida* spp., *Trichosporon* spp., e *Rhodotorula* spp. *Candida* sp. foi o gênero de fungo mais frequentemente isolado (5,1%), seguido por *Penicillium* sp. (3,2%), *Mucor* spp. (1,6%), *Aspergillus* spp. (1,6%), *Cladosporium* spp. (1,6%), *Trichosporon* sp. (0,8%) e *Rhodotorula* spp. (0,4%).

Dentre as espécies de *Candida* isoladas no presente estudo, *Candida tropicalis* foi observada em 2,0% das amostras, *Candida famata* em 1,2%, *Candida albicans* em 0,8%, *Candida guilliermondii* em 0,8% e *Candida lambica* em 0,4%. Dentre as 25 espécies de leveduras patogênicas emergentes, 20 são do gênero *Candida* sp., sendo que em humanos tem-se maior ocorrência de *C. albicans* (BRILHANTE et al., 2010). Em aves, *C. albicans* podem estar associadas a quadros gastrointestinais (JOSEPH, 2003; BRILHANTE et al., 2010).

Neste trabalho foram isoladas leveduras do gênero *Trichosporon* sp. em 0,8% (N=2) das amostras. *Trichosporon* spp. são fungos ambientais que podem ser encontrados no solo, água e ocasionalmente fazem parte da microbiota de pele e de unhas em humanos. Atualmente são consideradas patógenos oportunistas emergentes em pacientes imunossuprimidos, sendo o principal gênero de leveduras envolvidas em infecções após aquelas causadas por *Candida* spp. (RIBEIRO et al., 2008).

Rhodotorula spp. são micro-organismos comensais presentes na pele, unha e mucosas, além de serem encontradas no ambiente - ar e solo. Nos últimos anos estas

leveduras passaram a ser consideradas agentes oportunistas em indivíduos imunossuprimidos, tendo-se constatado sua associação a pacientes que fazem uso constante de catéteres, ou que apresentem doenças como endocardite ou peritonite (TUON; COSTA, 2008). No presente estudo, *Rhodotorula* sp. foi isolada somente de um indivíduo.

Marinho et al. (2010) ao avaliar a participação das aves mantidas em cativeiro na epidemiologia das doenças infecciosas de origem fúngica, coletaram fezes de 36 passeriformes de criatórios da região Noroeste de São Paulo e isolaram fungos em 100% das amostras, obtendo os seguintes resultados: *Penicillium* spp. em 25% (9/36) das amostras, *Trichosporon* spp. em 19,4% (7/36), *Cryptococcus gattii* em 13,9% (5/36), *Candida* spp. em 11,1% (4/36), *Rhizomucor* spp. em 8,3% (3/36), *Aspergillus* spp. em 8,3% (3/36), *Nigrospora* spp. 2,8% (1/36) e *Geotrichum* spp. em 2,8% (1/36). Os autores concluíram que passeriformes saudáveis carregam agentes fúngicos patogênicos nas fezes. No presente estudo foram isolados de passeriformes apreendidos do tráfico, os mesmos agentes relatados por Marinho et al. (2010), à exceção de *Cryptococcus gattii*, *Rhizomucor* spp., *Geotrichum* spp. e *Nigrospora* spp.

Por sua vez, Santos et al. (2009) realizaram pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. em 14 suabes cloacais de psitacídeos e passeriformes em cativeiro, e verificaram que todas as amostras foram negativas para estes agentes. Ao contrário do observado por Santos et al. (2009), *Candida* spp. foram isoladas de 5,1% das amostras avaliadas no presente estudo, ao passo que em ambos os estudos não foram isolados *Cryptococcus neoformans*. De maneira similar, Lugarini et al. (2008) avaliaram a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em amostras obtidas de cloaca de 60 passeriformes encaminhados para o Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) PUCPR/IBAMA no Estado do Paraná sendo que todas foram negativas para estes agentes. É importante ressaltar que não foi obtido isolamento de *Cryptococcus* spp. em todos os estudos referidos, sendo este um dos micro-organismos cuja pesquisa é obrigatória para fins de programas de soltura de acordo com a IN-179 (IBAMA, 2008).

Penicillium spp. são normalmente considerados contaminantes mas podem estar associados a diferentes doenças em humanos como ceratites, infecções no conduto auditivo externo bem como endocardites. Nyakundi e Mwangi (2011) relataram a ocorrência deste agente bem como de *Mucor* spp. nas fezes de marabu (*Leptoptilos*

crumeniferus). No presente trabalho, foi o fungo filamentoso mais frequentemente isolado, estando presente em 3,2% dos animais avaliados.

Mucor spp. são normalmente considerados contaminantes mas, ocasionalmente, podem estar associados à zigomicose, bem como podem acometer indivíduos imunossuprimidos, causando infecções no trato respiratório, gastrointestinal, sistema nervoso ou pele (PEREZ-URIBE et al., 2005). No presente trabalho *Mucor* spp. foi isolado em 1,6% das amostras.

Aspergillus spp. foram isolados em 1,6% das amostras avaliadas. A aspergilose é uma doença fúngica que acomete principalmente o trato respiratório de aves. As aves em cativeiro são mais suscetíveis à aspergilose, pois estão expostas a um maior acúmulo de esporos no ambiente, particularmente em casos de ventilação inadequada e presença de umidade excessiva, associados ainda a fatores que comprometem a imunidade como estresse, manejo inadequado, superpopulação, alimentação inadequada, dentre outros (BEERNAERT et al., 2010).

A ocorrência de doenças infecciosas em passeriformes geralmente está associada à situações de estresse e/ou condições de higiene precárias a que possam estar submetidos, situações estas que podem comprometer a imunidade dos animais e permitir que agentes oportunistas possam desencadear doenças. O presente estudo permitiu constatar que a maior parte (62,5%) dos passeriformes apreendidos do tráfico submetidos à avaliação apresentavam bactérias anaeróbias facultativas e/ou fungos em suas cloacas, com maior frequência de ocorrência de *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.. Deve-se destacar a elevada ocorrência de enterobactérias, fenômeno possivelmente relacionado às condições sanitárias nas quais geralmente são mantidos os animais apreendidos do tráfico.

Considerando-se a reduzida ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência em isolados de *E.coli* entende-se que os passeriformes apreendidos do tráfico representam baixo risco potencial no tocante à transmissão de estirpes de EPECs, APECs e UPECs para outros animais ou mesmo para o ser humano. Por outro lado deve-se considerar o risco potencial de transmissão intra ou interespécies de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos bem como a introdução destes micro-organismos no ambiente.

No tocante particularmente à ocorrência de *Salmonella* spp., micro-organismos estes que devem ser pesquisados nos exames preconizados pelo IBAMA (IN-179) para

que o animal possa ser submetido a programas de soltura, pôde-se constatar que todas as amostras pesquisadas foram negativas para este agente. De forma similar verificou-se ausência de amostras positivas para *Cryptococcus* spp. bem como uma reduzida ocorrência de *Candida* spp. (5,1%), micro-organismos que também compõem o leque de exames obrigatórios para programas de soltura. Assim sendo, fica evidente que embora a realização de exames que garantam a sanidade de animais que venham a ser submetidos a programas de soltura, constitua uma ferramenta importante e que não deve ser descartada, no que diz respeito à *Salmonella* spp., *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. pode-se afirmar que os riscos de disseminação destes agentes são reduzidos ou mesmo inexistentes.

Deve-se ressaltar ainda a importância da realização de campanhas educacionais no sentido de desestimular a população para a aquisição destes animais, bem como para esclarecer sobre o crime e o prejuízo ambiental associados a esta ação, enfatizando que a retirada um animal de seu *habitat*, pode ter consequências muito mais abrangentes, com comprometimento de toda uma biodiversidade e desequilíbrio de um ecossistema. A redução da procura e aquisição de passeriformes silvestres provavelmente terá um efeito diretamente proporcional na redução do tráfico dos mesmos.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A maior parte dos passeriformes apreendidos do tráfico apresentam uma microbiota cloacal constituída por bactéria aeróbias e/ou anaeróbias facultativas e/ou fungos
- ✓ Os micro-organismos mais frequentemente observados na microbiota de cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico são *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.
- ✓ Existe uma maior ocorrência de bactérias Gram positivas seguidas por bactérias Gram negativas e fungos na microbiota cloacal de passeriformes apreendidos do tráfico
- ✓ É elevado o índice de bactérias Gram negativas presentes na microbiota cloacal de passeriformes apreendidos do tráfico
- ✓ Ao menos 14 gêneros de bactérias, 03 gêneros de leveduras e 04 gêneros de fungos filamentosos podem fazer parte da microbiota da cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico
- ✓ *Staphylococcus* spp. é o gênero bacteriano isolado com maior frequência da microbiota da cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico
- ✓ *Candida* spp. é o gênero fúngico isolado com maior frequência da microbiota da cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico
- ✓ Os riscos de disseminação de *Salmonella* spp., *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. são pouco prováveis quando considerados programas de soltura
- ✓ *E.coli* isoladas de amostras de cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico apresentam multirresistência aos antimicrobianos, bem como podem apresentar genes codificadores de fatores de virulência, embora em frequência reduzida, e não apresentam perfil compatível com EPEC
- ✓ Todos os microrganismos isolados de cloaca de passeriformes apreendidos do tráfico podem representar risco para a saúde humana e animal

REFERÊNCIAS

- ALLEY, M. R.; CONNOLLY, J. H.; FENWICK, S. G.; MACKERETH, G. F.; LEYLAND, M. J.; ROGERS, L. E.; HAYCOCK, M.; NICOL, C.; REED, C. E. M. An epidemic of salmonellosis caused by *Salmonella* Typhimurium DT160 in wild birds and humans in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 50, n. 5; p 170-176, 2002.
- ARANDA, K.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF, Y. M. (Ed). **Disease of poultry**. 11. ed. Ames: University Press, 2001. p. 631-656.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. Cambridge: University Press, 2000.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.
- BEERNAERT, L. A.; PASMANS, F.; WAYENBERGHE, V.; HAESBROUCK, F.; MARTEL, A. *Aspergillus* infections in bird: a review. **Avian Pathology**, v. 39, n. 5, p. 325-331, 2010.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). **Medical Microbiology**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.
- BOPP, C.A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 459-482.
- BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v. 39, p. 1673-1680, 2001.
- BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SOARES, G. D. P.; ASTETE-MEDRANO, D. J.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potencial hazard to human health. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 718-723, 2010.
- BRITTINGHAM, M. C.; TEMPLE, S. A.; DUNCAN, R. M. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 2, p. 299-307, 1988.

CAFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N.C.; TULIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v. 161, p. 229-234, 2006.

CATÃO-DIAS, J. L. Biossegurança na Manipulação de Animais Silvestres. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, n. 1, p.178-181, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI) **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal: approved standard M31-A3**. 3ed. v. 28, n. 2008.

CORRÊA, S. H. R.; PASSOS, E. C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of south american wild animals**. Iowa: State University Press: 2001. p. 493–499.

DANIELS, M. J.; HUTCHINGS, M. R.; GREIG, A. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. **Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 3, p. 561-568, 2003.

DONNEMBERG, M. S.; WELCH, R. A. Virulence determinants in uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H. L. T.; WARREN, J. W. (ed) **Urinary Tract Infections: molecular pathogenesis and clinical management**. Washington, DC: ASM Press, 1996.135–174.

DORRESTEIN, G. M. Bacteriology. In: ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; DORRESTEIN, G. M.; QUESEBERRY, M. (ed.) **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, , 1997. p. 255-280.

DORRESTEIN, G. M. Bacterial and parasitic diseases of passerines. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 433-451, 2009.

EWERS, C.; JANSEN T.; KIESLING, S.; PHILIPP, H-C.; WIELER, L. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 49, n. 2, p. 269–273, 2005.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H.. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p.163-176, 2007.

FARMER, J. J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 442-459.

FIENNES, R. N. Diseases of bacterial origin. In: PETRAK, M. L. **Diseases of cage and aviary birds**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p. 497-514.

FILHO, S. **Comissão parlamentar de inquérito destinada a investigar o tráfico ilegal de animais e plantas silvestres da fauna e flora brasileiras**. 2002. Disponível em:<http://www.renctas.org.br/pt/trafico/rel_cpi.asp>. Acesso em: 20 jan. 2012.

FISCHETI, V. A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J. J. (ed.). 2 edn. **Gram-positive pathogens**. Washington: ASM Press, 2006.

FOTI, M.; RINALDO, D.; GUERCIO, A.; GIACOPELLO, C.; ALEO, A.; LEO, F.D.; FISICHELLA, V.; MAMMINA, C. Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica, Sicily (Italy). **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 405-409, 2011.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 39-45, 2002.

GIBBS, P. S.; KASA, R.; NEWBREY, J. L.; PETERMANN, S. R.; WOOLEY, R. E.; VINSON, H. M.; REED, W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members from the family *Enterobacteriaceae* from the feces of yellow-headed blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. **Avian diseases**, v. 51, p. 649-655, 2007.

GLUNDER, G. Occurrence of *Enterobacteriaceae* in feces of granivorous passeriform birds. **Avian diseases**, v. 25, n. 1, p. 195-198, 1980.

GOMES, M. S. **Implantação de medidas profiláticas no Zoológico do Município de São Bernardo do Campo**: uma análise de custo - benefício. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A Survey of diseases in passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo city, Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 199-209, 2010.

GOPEE, N. V.; ADESIYUN, A. A.; CAESAR, K. A Longitudinal study of *Escherichia coli* Strains isolated from captive mammals, birds and reptiles in Trinidad. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 3, p. 353-360, 2000.

GRAPHPAD instant software. **Statistical analysis for personal computers**. [S. l]: GRAPHPAD, 1992-1998.

GUIMARÃES, M. B. Passeriformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**: medicina veterinária. Roca, São Paulo, 2007. p. 324-337.

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

HEDAYATI, M.; MAYAHI, S.; FAKHAR, M.; SHOKOHI, T.; MAJIDI, M. *Cryptococcus neoformans* Isolation from swallow (*Hirundo rustica*) excreta in Iran. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 53, n. 3, p. 125-127, 2011.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, p. 639-659, 2004.

HUGHES, L. A.; BENNETT, M.; COFFEY, P.; ELLIOT, J.; JONES, T. R.; JONES, R. C.; LAHUERTA-MARIN, A.; MCNIFFE, K.; NORMAN, D.; WILLIAMS, N. J.; CHANTREY, J. Risk factors for the occurrence of *Escherichia coli* virulence genes *eae*, *stx1* and *stx2* in wild bird populations. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 1574-1582, 2009.

HUNTER, B.; HUNTER B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minneapolis: Burgess Publishing, 1998.

IBAMA. - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Instrução normativa nº – 179**. IBAMA, 2008.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. 2002. **Guidelines for the placement of confiscated animals, Prepared by the IUCN/SSC Re-introduction specialist group**. IUCN, Gland, Switzerland and ERWDA, Abu Dhabi, UAE. Disponível em: <http://www.iucn.org/themes/ssc/publications/policies_guidelines.htm>. Acesso em: out.2011.

JOHNSON, J. R. Urinary tract infection. In: SUSSMAN, M. ***Escherichia coli* mechanisms of virulence**. Local: Cambridge University Press, 1997. P .495-549.

JOHNSON, T. J.; GIDDINGS, C. W.; HORNE, S. M.; GIBBS, P. S.; WOOLEY, R. E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J. S.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Disease**, v. 46, p. 342-352, 2002

JOSEPH, V. Infections and parasitic diseases of captive passerines. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 12, n. 1, p. 21-28, 2003.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KIRK, J. H.; HOLMBERG, C.A.; JEFFREY, J.S. Prevalence of *Salmonella* spp in selected birds captured on California dairies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 3, p. 359-362, 2002.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5548-5554, 2004.

LUGARINI, C.; CONDAS, L. A. Z.; SORESINI, G. C. G; SANTOS, R. C. F.; MURO, M. D.; ONO, M.; FARIAS, M.R.; FERREIRA, F.M. Screening of antigenemia and isolation of *Cryptococcus neoformans* and *C. Gatti* from cloaca and crop of birds in the state of Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.7, p. 341-344,2008

MALUCHE, M. E; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p. 65-67,2008

MARINHO, M.; TÁPARO, C. V.; SILVA, B. G.; TENCATTE, L. N.; PERRI, S.H. V. Microbiota Fúngica de Passeriformes de Cativeiro da Região Noroeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v.17(2), p.288-293,2010.

McCLUGGAGE, D. M. Zoonotic disorders. In: ROSSKOPF, W. J., WOERPEL, R. W. **Diseases of cage and aviary birds**. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins,1996.

MARINI, M. A.; GARCIA, F.I. Bird conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 665-671, 2005.

MORISHITA, T. Y.; AYE, P. P.; LEY, E. C.; HARR, B. Survey of pathogens and blood parasites in free-living passerines. **Avian diseases**, v. 43, p. 549-552, 1999.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; RÉPÉRANT, M.; LAURENT, S.; BRÉE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3366-3376, 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142–201, 1998.

NYAKUNDI, W. O.; MWANGI, W. Isolation and characterization of pathogenic bacteria and fungi from *Leptoptilos crumeniferus* (marabou stork) droppings. **Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation**, v. 1, p. 93-106, 2011.

OH, J. Y.; KANG, M.S.; HWANG, H. T.; AN, B. K.; KWON, J. H.; KWON, Y. K. Epidemiological Investigation of *eaeA*-Positive *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* Strains Isolated from healthy Wild Birds. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 747-752, 2011.

ORSKOV, F. *Escherichia coli*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 420-423.

LOUDIZ, R. J.; WIDLITZ, A.; BECKMANN, J.; CAMANGA, D.; ALFIE, J.; BRUNDAGE, B. H.; BARST, R. J. Micrococcus-Associated Central Venous Catheter Infection in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Chestjournal**, v. 126, n. 1, p. 90-94, 2004.

PALMGREN, H.; SELLIN, M.; BERGSTROM, S.; OLSEN, B. Enteropathogenic Bacteria in Migrating Birds Arriving in Sweden. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 565-568, 1997.

PEETERS, J. E. *Escherichia coli* infections in rabbit, cats, dogs, cats, and horses, p.261-283. In: GYLES C. L. (Ed.) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. , Wallingford, UK: CAB International 1994.

PEREZ-URIBE, A.; SOSCHIN, D.M.; ARENAS, R.; REYES, M. Mucormycosis cutánea primaria en un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 118-121, 2005.

PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER, H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. **Veterinary Record**, v. 24, p. 817-820, 2006.

REFSUM, T.; HANDELAND, K.; BAGGESEN, D. L.; HOLSTAD, G.; KAPPERUD, G. Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5595-5599, 2002.

RENTAS. **Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. 1 Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre**. 2001. Disponível em: http://www.rentas.org.br/pt/trafico/rel_rentas. Acesso em: out. 2011.

RENTAS. **Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. Fique por dentro**. 2002. Disponível em: www.rentas.org.br/pt/informese/rentas. Acesso em: out. 2011.

RIBEIRO, L. B.; SILVA, M. G. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 59, n. 4, p. 4-5, 2007.

RIBEIRO, M. A.; IZQUIERDO, A. L.; LOPEZ, A. G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ESTRELLA, M. C. Molecular identification and susceptibility testing of isolates from a Brazilian hospital. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 221-225, 2008.

ROSSI, D. C.; MUNÓZ, J. E.; CARVALHO, D. D.; BELMONTE, R.; FAINTUCH, B.; BORELLI, P.; MIRANDA, A.; TABORDA, C. P.; DAFFRE, S. Therapeutic use a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. **BMC Microbiology**, v. 12, n.28, 2012.

SAIDENBERG, A. B. S.; KNOBL, T. Colibacilose em aves silvestres. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 8, n. 1/3, p. 16-28, 2005.

SANCHES, C. T. **Causas de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na Região Metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico**. 2008. 185 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAYLERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Local: Library of Congress Cataloging in Publication Data. 1994. p. 190- 212.

SANTOS, L. L.; FERREIRA, F. M.; LOPES, S. F.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; LUGARINI, C. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* E *Candida* spp. em excretas de psittacídeos e passeriformes cativos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2009.

SIMBIEDA, J. L.; MILLER, W. A.; BYRNE, B. A.; ZICCARDI, M. H.; ANDERSON, N.; CHOUICHA, N.; SANDROCK, C. E.; JOHNSON, C. K. Zoonotic pathogens isolated from wild animals and environmental samples at two California wildlife hospitals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 6, p. 773-783. 2011.

SOSFAUNA. **O tráfico de animais silvestres no Brasil**. Disponível em: <<http://sosfauna.org.br/trafico.php>>. Acesso em: 01 maio 2012.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge; Reino Unido: University Press, 1997. p. 3-48.

TIZARD, I. R.; FISH, N. A.; HARMESON, J. Free flying sparrows as carriers of salmonellosis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 20, p. 143-144, 1979.

TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 2, p. 50-66, 2004.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 135-140, 2008.

TSIODRAS, S.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; BAUCHINGER, U.; FALAGAS, M. E. Human infections associated with wild birds. **Journal of Infection**, v. 56, p. 83-98, 2008.

WIELER, L. H.; WIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2980-2984, 1996.

WOEBESER, G. A.; FINLAYSON, M. *Salmonella typhimurium* infection in house sparrows. **Archives of Environmental Health**. v. 19, p. 882-884, 1969.

YAMAMOTO, S.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.12, p. 85-90, 1995.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p.145-152, 2007.

APÊNDICE A

1	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>Candida tropicalis</i>
2	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Trischosporon beigeli</i> .
3	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida famata</i>
4	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Edwardsiella tarda</i> biogrupo I
5	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> , <i>Escherichia coli</i>
6	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus kloosii</i>
7	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> , <i>Micrococcus</i> sp.
8	<i>Micrococcus</i> sp.
9	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacillus</i> sp.
10	<i>Penicillium</i> sp.
11	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Rhodotorula</i> sp.
12	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Candida tropicalis</i>
13	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida tropicalis</i>
14	<i>Enterococcus avium</i> , <i>Candida lambica</i>
15	<i>Staphylococcus kloosii</i> , <i>Bacillus</i> sp.
16	<i>Bacillus</i> sp.
17	<i>Candida tropicalis</i>
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> , <i>Candida guilliermondii</i>
19	<i>Candida guilliermondii</i>
20	<i>Staphylococcus simulans</i>
21	<i>Bacillus</i> sp.
22	<i>Mucor</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.
23	<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> , <i>Mucor</i> sp.
24	<i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>Candida famata</i>

- 25 *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*
- 26 *Staphylococcus kloosii*, *Aspergillus* sp.
- 27 *Micrococcus* sp., *Staphylococcus simulans*, *Candida famata*
- 28 *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp.
- 29 *Cladosporium* sp., *Micrococcus* sp.
- 30 *Staphylococcus kloosii*
- 31 *Mucor* sp, *Micrococcus* sp.
- 32 *Staphylococcus kloosii*, *Aspergillus* sp.
- 33 *Staphylococcus kloosii*
- 34 *Staphylococcus kloosii*
- 35 *Acinetobacter* sp, *Micrococcus* sp., *Aspergillus* sp.
- 36 *Staphylococcus haemolyticus*
- 37 *Staphylococcus kloosii*, *Streptococcus mutans*, *Penicillium* sp.
- 38 *Penicillium* sp., *Streptococcus mitior*
- 39 *Penicillium* sp., *Micrococcus* sp.
- 40 *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter amalonaticus*
- 41 *Bacillus* sp., *Penicillium* sp.
- 42 *Klebsiella oxytoca*, *Mucor* sp., *Bacillus* sp.
- 43 *Bacillus* sp, *Penicillium* sp.
- 44 *Staphylococcus* sp., *Penicillium* sp, *Candida tropicalis*.
- 45 *Staphylococcus* sp, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozanae*
- 46 *Bacillus* sp.
- 47 *Staphylococcus kloosii*.
- 48 *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus gallinarum*
- 49 *Streptococcus mutans*
- 50 *Citrobacter diversus*
- 51 *Micrococcus* sp.
- 52 *Staphylococcus* sp.

53	<i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Cladosporium</i> sp.
54	<i>Staphylococcus simulans</i>
55	<i>Streptococcus mutans</i>
56	<i>Cladosporium</i> sp.
57	<i>Micrococcus</i> sp.
58	<i>Micrococcus</i> sp.
59	<i>Bacillus</i> sp.
60	<i>Bacillus</i> sp.
61	<i>Micrococcus</i> sp.
62	<i>Bacillus</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.
63	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
64	<i>Pasteurella multocida</i>
65	<i>Staphylococcus hominis</i>
66	<i>Micrococcus</i> sp, <i>Bacillus</i> sp.
67	<i>Staphylococcus hominis</i>
68	<i>Bacillus</i> sp.
69	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
70	<i>Bacillus</i> sp, <i>Acinetobacter</i> sp.
71	<i>Acinetobacter</i> sp.
72	<i>Acinetobacter</i> sp.
73	<i>Micrococcus</i> sp.
74	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i> , <i>Serratia marcescens</i>
75	<i>Enterobacter cloacae</i>
76	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Candida albicans</i>
77	<i>Edwardsiella tarda</i> biogrupo I
78	<i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> biogrupo I
79	<i>Micrococcus</i> sp.
80	<i>Micrococcus</i> sp.

81	<i>Enterobacter cloacae</i>
82	<i>Enterobacter cloacae</i>
83	<i>Micrococcus</i> sp.
84	<i>Enterobacter cloacae</i>
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i>
86	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i>
87	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Bacillus</i> sp.
88	<i>Escherichia coli</i>
89	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
90	<i>klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>citrobacter freundii</i>
91	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Penicillium</i> sp.
92	<i>Bacillus</i> sp.
93	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozanae</i>
94	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
95	<i>Staphylococcus xylosus</i>
96	<i>Escherichia coli</i>
97	<i>Trichosporon beigeli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
98	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>ozanae</i>
99	<i>Micrococcus</i> sp.
100	<i>Staphylococcus simulans</i>
101	<i>Micrococcus</i> sp.
102	<i>Micrococcus</i> sp.
103	<i>Micrococcus</i> sp.
104	<i>Micrococcus</i> sp.
105	<i>Escherichia coli</i>
106	<i>Enterococcus avium</i>
107	<i>Bacillus</i> sp.
108	<i>Micrococcus</i> sp.

109	<i>Micrococcus</i> sp.
110	<i>Staphylococcus pscifermentans</i>
111	<i>Klebsiella oxytoca</i>
112	<i>Staphylococcus simulans</i>
113	<i>Micrococcus</i> sp.
114	<i>Streptococcus avium</i>
115	<i>Klebsiella oxytoca</i>
116	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
117	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozanae</i>
118	<i>Escherichia coli</i>
119	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
120	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozanae</i> , <i>Escherichia coli</i>
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>
123	<i>Enterococcus avium</i>
124	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>Edwardsiella hoshinae</i>
125	<i>Enterobacter cloacae</i>
126	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
127	<i>Enterococcus avium</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> .
128	<i>Staphylococcus aureus</i>
129	<i>Staphylococcus aureus</i>
130	<i>Streptococcus avium</i>
131	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>azanae</i>
132	<i>Escherichia coli</i>
133	<i>Streptococcus avium</i>
134	<i>Escherichia coli</i>
135	<i>Streptococcus avium</i>

136	<i>Escherichia coli</i>
137	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i>
138	<i>Escherichia coli</i>
139	<i>Escherichia coli</i>
140	<i>Serratia marcescens</i>
141	<i>Escherichia coli</i>
142	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
143	<i>Streptococcus avium</i>
144	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> , <i>Citrobacter diversus</i>
145	<i>Escherichia coli</i>
146	<i>Escherichia coli</i>
147	<i>Escherichia coli</i>
148	<i>Escherichia coli</i>
149	<i>Escherichia coli</i>
150	<i>Escherichia coli</i>
151	<i>Escherichia coli</i>
152	<i>Escherichia coli</i>
153	<i>Escherichia coli</i>
154	<i>Escherichia coli</i>
155	<i>Escherichia coli</i>
156	<i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus hominis</i>
157	<i>Enterobacter cloacae</i>
158	<i>Streptococcus avium</i>