

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterianos em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no estado do Rio de Janeiro - Brasil: riscos para a saúde pública”***

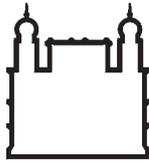
*por*

***Carlos Alexandre Rey Matias***

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientador principal: Prof. Dr. Salvatore Siciliano  
Segunda orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dália dos Prazeres Rodrigues*

*Rio de Janeiro, março de 2014.*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta tese, intitulada*

***“Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterianos em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no estado do Rio de Janeiro - Brasil: riscos para a saúde pública”***

*apresentada por*

***Carlos Alexandre Rey Matias***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Norma dos Santos Lázaro

Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gina Torres Rego Monteiro

Prof. Dr. Salvatore Siciliano – Orientador principal

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

M433 Matias., Carlos Alexandre Rey  
Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterianos  
em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no  
estado do Rio de Janeiro - Brasil: riscos para a saúde pública. /  
Carlos Alexandre Rey Matias. -- 2014.  
xvii,134 f. : il. ; tab. ; mapas  
Orientador: Siciliano, Salvatore  
Rodrigues, Dália dos Prazeres  
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública  
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.  
1. Doenças das Aves. 2. Enterobacteriaceae. 3. Zoonoses.  
4. Saúde Pública. 5. Farmacorresistência Bacteriana Múltipla.  
I. Título.  
CDD – 22.ed. – 614.560981

*Dedico esta obra aos Mentores da Criação, aos meus queridos pais e familiares, e a  
Elisa e Júlia, minhas eternas fontes de inspiração, que me ensinam a cada dia a ser  
uma pessoa melhor.*

## Agradecimentos

Ao meu pai, Antonio Viana Matias, que sempre foi um exemplo seguir, por me estimular nos momentos mais difíceis.

As minhas filhas, Elisa Almeida Matias e Júlia Almeida Matias, obrigado pelos ensinamentos diários.

Aos amigos incríveis que fiz nesse período, poderia citar alguns... em todos os lugares e etapas de nossa vida, as amizades que fazemos são a maior riqueza. Obrigado por estarem ao meu lado nos mais variados momentos. Estarei sempre com vocês.

Ao “No Limits”, Marco Aurélio Horta, Cléber Cremonese e Poliany Rodrigues. Família não é sangue, família é sintonia...

Aos amigos Arnaldo Couto e Luciana Alves, por me acudirem nos momentos difíceis com a estatística.

A amiga e irmã Tatiana Bernacci Sanchez, pela revisão do português e pelas valiosas sugestões.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente que tive o prazer de ter, meu muito obrigado pelos ensinamentos, cada um de sua maneira.

Aos antigos companheiros de profissão, do Batalhão de Polícia Florestal e de Meio Ambiente da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro e aos mais recentes, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por sempre darem o suporte para o desenvolvimento desta tese.

A todos os companheiros do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz, técnicos de laboratório, administrativos e pesquisadores, pelos ensinamentos, apoio e suporte para o desenvolvimento das análises microbiológicas.

Aos funcionários do Centro e Triagem de Animais Silvestres do IBAMA do Rio de Janeiro, especialmente ao colega Vinícius Modesto de Oliveira, pelo suporte na coleta de material biológico dos animais e por sua dedicação no combate ao tráfico de animais silvestres, apesar de todo o tipo de dificuldades.

As aves silvestres que mesmo sem o livre arbítrio para escolherem fazer parte desse estudo e por serem vítimas da ganância do homem, podem contribuir para aumentar o conhecimento da humanidade.

A Dr.<sup>a</sup> Dália dos Prazeres Rodrigues pelos ensinamentos e orientação.

Ao Dr.<sup>o</sup> Salvatore Siciliano pela confiança em meu trabalho, ensinamentos e orientação.

“O mundo tornou-se perigoso, porque os homens aprenderam a dominar a natureza antes de se dominarem a si mesmos.”

*Albert Schweitzer*

## Abstract

This study aimed to evaluate the role of wild birds seized in the illegal trade in the Rio de Janeiro State, as a reservoir of bacterial pathogens and the risk of transmission to humans. Samples of 109 animals were collected, the majority passerines from Emberezidae and Thraupidae families. Regarding the isolation of Enterobacteriaceae, there was a prevalence of 78,9%. Different bacteria were isolated per individual, with a richness of 1,68, especially *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. and *Klebsiella pneumoniae*. One strain of *Salmonella* serovar Typhimurium was isolated from a Temminck's Seedeater and two *Salmonella* serovar Panama isolates from two Chestnut-capped Blackbird. The results showed that these serovars are circulating in Brazil, which was reinforced by PFGE analysis, that compared the strains isolated with others involved in outbreaks in several regions of the country. The *Salmonella* serovar Typhimurium strain showed 100% of similarity with two samples involved in human outbreaks. The isolates showed a high percentage of antimicrobial resistance, with some samples showing resistance to nine of the antibiotics tested. No bacteria of Vibrionaceae and Aeromonadaceae families were isolated, indicating that these birds are not important reservoirs of these bacteria. *Staphylococcus* strains were isolated in 45,9% of the samples. The detection of species that don't have wild birds as natural hosts, the high proportion of strains with varying degrees of resistance to  $\beta$ -lactams, lincosamide and tetracycline, and also the presence of genes associated with multidrug resistance phenotype, suggests that these animals may have an important role in the transmission of these pathogens and in the spread of antimicrobial resistance mechanisms. A constant monitoring of wild birds seized in the illegal trade is recommended, with the implementation of quarantine procedures to prevent that the release and disposal of these animals can contribute to the spread of strains with zoonotic potential and with antibiotic multi-resistance profile. Special attention should be given to those involved in the management of wild species, since most contact and handling of these animals expose these professionals to a greater risk of transmission of zoonotic agents.

Keywords: Bird Diseases, Enterobacteriaceae, Zoonoses, Public Health, Drug Resistance, Multiple, Bacterial.

## Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da avifauna silvestre apreendida no Estado do Rio de Janeiro, oriunda do comércio ilegal, como reservatórios de enteropatógenos bacterianos e o risco de transmissão para o homem. Foram coletadas amostras de 109 animais, sendo a maioria, passeriformes das famílias Emberezidae e Thraupidae. Em relação ao isolamento de Enterobacteriaceae, houve uma prevalência de 78,9%. Diferentes bactérias por indivíduo foram isoladas, com uma riqueza de 1,68, com destaque para *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae*. Foram isoladas uma cepa de *Salmonella* sorovar Typhimurium de uma Cigarra-verdadeira e duas *Salmonella* sorovar Panama de dois indivíduos de Maria-preta. Os resultados demonstraram que estes sorovares circulam no Brasil, o que foi reforçado com a análise por PFGE, que comparou as cepas isoladas com outras isoladas de surtos em diversas regiões do país. A cepa de *Salmonella* sorovar Tiphymurium mostrou 100% de similaridade com duas amostras envolvidas em surtos de origem humana. Os isolados avaliados apresentaram um elevado percentual de resistência aos antimicrobianos, onde algumas amostras chegaram a apresentar resistência a nove dos antibióticos testados. Nenhuma bactéria das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae foram isoladas, indicando que estas espécies de aves não são reservatórios importantes destas bactérias. Cepas de *Staphylococcus* foram isolados em 45,9% das amostras. O isolamento de espécies que não tem as aves silvestres como hospedeiros naturais, a elevada proporção de cepas com graus de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, lincosamidas e tetraciclina, e ainda a presença de genes de resistência associada a fenótipos de multi-resistência sugere que esses animais podem ter papel relevante na transmissão desses patógenos e na disseminação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Recomenda-se o monitoramento constante das aves silvestres apreendidas no comércio ilegal, com a realização de procedimentos de quarentena para evitar que a soltura e destinação desses animais contribua para a disseminação de cepas com potencial zoonótico e com perfil de multi-resistência aos antibióticos. Atenção especial deve ser dada para aqueles envolvidos no manejo de espécies silvestres, uma vez que o maior contato e manipulação desses animais os expõe a um maior risco de transmissão a agentes zoonóticos.

Palavras-chave: Doenças das Aves, Enterobacteriaceae, Zoonoses, Saúde Pública, Farmacorresistência Bacteriana Múltipla.

## Lista de Figuras

Figura 1. Representação das principais rotas do tráfico de animais silvestres. ....	4
Artigo - Summary of the Bird Species Seized in the Illegal Trade in Rio de Janeiro, Brazil	
Figure 1: Seizures at Caxias street market: a Green-winged Saltator ( <i>Saltator similis</i> ) in a transport cage (left); caged songbirds species (centre); breeding parrots (right). ....	38
Artigo - Isolation of <i>Salmonella</i> in wild birds from wildlife illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health	
Figure 1: Temminck's Seedeater ( <i>Sporophila falcirostris</i> ) being sold in illegal wildlife trade. ....	67
Figure 2: Pulsed-field gel electrophoresis profile showing the four <i>Xba</i> I patterns of the <i>Salmonella</i> serovar Typhimurium strain identified from a Temminck's Seedeater faecal sample. ....	67
Figure 3: Pulsed-field gel electrophoresis profiles showing the four <i>Xba</i> I patterns of the two <i>Salmonella</i> serovar Panama strains identified from two Chestnut-capped Blackbird faecal sample showing the same clonal origin. ....	67
Artigo - Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds from the illegal wildlife trade in Rio de Janeiro	
Figure 1: A Creamy-bellied Thrush ( <i>Turdus amaurochalinus</i> ) and a Maroon-bellied Parakeet ( <i>Pyrrhura frontalis</i> ) seized in illegal street markets in Rio de Janeiro (Brazil). ....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1. Drogas antimicrobianas utilizadas na avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo Teste de Concentração Inibitória Mínima em cepas de Enterobacteriaceae .....	27
Tabela 2. Drogas antimicrobianas utilizadas na avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo Método de Difusão de Disco em Ágar em cepas da família Staphylococaceae .....	28
Tabela 3. Primers usados como indicadores na detecção de genes de resistência. ....	31
Artigo - Summary of the Bird Species Seized in the Illegal Trade in Rio de Janeiro, Brazil	
Table 1: List of species seized in illegal trade in street markets in Rio de Janeiro State, Brazil, during 2011.....	36
Artigo - Prevalence of zoonotic bacteria among wild birds from the illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health	
Table 1 Wild birds sampled in CETAS, Rio de Janeiro (Brazil) from March 2011 to March 2012. ....	48
Table 2: Prevalences of Enterobacteriaceae from wild birds families in CETAS, Rio de Janeiro, Brazil, March 2011 to March 2012. ....	51
Table 3: Enterobacteriaceae isolated from wild birds in CETAS, Rio de Janeiro, Brazil, March 2011 to March 2012, tested for antibiotic resistance. ....	52
Artigo - Isolation of Salmonella in wild birds from wildlife illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health	
Table 1: <i>Salmonella</i> isolated from wildbirds in CETAS and tested form antibiotic resistance, March 2011 to March 2012. ....	66
Artigo - Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds from the illegal wildlife trade in Rio de Janeiro	
Table 1: Wild birds sampled in CETAS, Rio de Janeiro (Brazil) from March, 2011 to March, 2012. ....	77

Artigo - <i>Staphylococcus</i> isolados em aves silvestres no Rio de Janeiro, Brasil - relevância para a Saúde Pública	
Tabela 1: Aves silvestres submetidas a <i>swab</i> de cloaca no CETAS, Rio de Janeiro (Brasil) entre março de 2011 a março de 2012. ....	85
Tabela 2: Frequência de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados das aves silvestres de acordo com o hábito alimentar. ....	90
Tabela 3: Resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. das aves silvestres, de acordo com o hábito alimentar. ....	91
Tabela 4: Padrões de resistência antimicrobiana e distribuição dos genes <i>mecA</i> e <i>blaZ</i> de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de aves silvestres. ....	92

## Lista de Abreviações, Siglas e Símbolos

µL: microlitro

µg/mL: micrograma por mililitro

AMP: ampicilina

APA: Água Peptonada Alcalina

BPFMA: Batalhão de Polícia Florestal e de Meio Ambiente

CBRO: Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

CEF: ceftiofur

CETAS-RJ: Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHL: cloranfenicol

CIM: Teste de Concentração Inibitória Mínima

CIP: ciprofloxacina

CLI: clindamicina

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CoNS: *Staphylococcus* coagulase-negativos

CoPS: *Staphylococcus* coagulase-positivos

CRO: ceftriaxona

DAEC: *Escherichia coli* shigatoxigênica difusamente aderente

EAEC: *Escherichia coli* shigatoxigênica enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* shigatoxigênica enterohemorágica

EIEC: *Escherichia coli* shigatoxigênica enteroinvasiva

ENR: enrofloxacin

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ERI: eritromicina

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC: *Escherichia coli* patogênicas extraintestinais

FOX: cefoxitina

GEN: gentamicina

GSP: *Pseudomonas-Aeromonas* Selective Agar Base

ICMBio: Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IOC/ FIOCRUZ: Instituto Oswaldo Cruz

LRNEB: Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas

mg/mL: miligrama por mililitro

mL: mililitro

NaCl: cloreto de sódio

NAL: ácido nalidíxico

NIT: nitrofurantoína

OIE: Organização Mundial para a Saúde Animal

OMS: Organização Mundial de Saúde

OXA: oxacilina

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsante

PMERJ: Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro

RPM: rotações por minuto

STEC: *Escherichia coli* shigatoxigênica

SXT: sulfametoxazol/Trimetoprim

TCBS: Tioossulfato Citrato Bile Sacarose

TCY: tetraciclina

UFC/mL: unidade formadora de colônia por mililitro

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênicas

VAN: vancomicina

## Sumário

1.	Capítulo .....	1
	Contextualização .....	1
1.1.	Revisão de literatura .....	2
1.1.1.	<i>O tráfico de animais selvagens</i> .....	2
1.1.2.	<i>O perfil da fauna traficada</i> .....	5
1.1.3.	<i>O risco da transmissão de doenças</i> .....	6
1.1.4.	<i>Patógenos bacterianos em aves silvestres e seu potencial zoonótico</i> .....	9
1.1.4.1.	<i>Infecções por bactérias da família Enterobacteriaceae</i> .....	10
1.1.4.2.	<i>Infecções por bactérias da família Vibrionaceae</i> .....	13
1.1.4.3.	<i>Infecções por bactérias da família Aeromonadaceae</i> .....	13
1.1.4.4.	<i>Infecções por bactérias da família Staphylococcaceae</i> .....	14
1.1.5.	<i>Bactérias resistentes aos antimicrobianos em aves silvestres</i> .....	14
1.1.6.	<i>Susceptibilidade das aves silvestres as infecções bacterianas</i> .....	17
1.1.7.	<i>Exposição das aves às enterobactérias</i> .....	18
1.1.8.	<i>Destinação da fauna apreendida e a importância do controle sanitário</i> .....	19
1.2.	Justificativa .....	20
1.3.	Objetivos .....	21
1.3.1.	<i>Objetivo Geral</i> .....	21
1.3.2.	<i>Objetivos Específicos</i> .....	21
2.	Capítulo .....	22
	Metodologia .....	22
2.1.	Local do estudo .....	22
2.2.	Seleção dos animais .....	22
2.3.	Coleta de dados nas aves .....	22
2.4.	Análise microbiológica .....	23
2.5.	Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos .....	25
2.5.1.	<i>Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	25

2.5.2. Método de Difusão de Disco em Ágar .....	26
2.5.3. Drogas antimicrobianas .....	26
2.6. Caracterização molecular das amostras .....	29
2.6.1. Eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE) .....	29
2.6.2. Caracterização de genes de resistência .....	29
2.6.3. Caracterização de genes de virulência em cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.7. Autorizações .....	32
3. Capítulo – Perfil da avifauna apreendida no comércio ilegal no Rio de Janeiro .....	33
Artigo - Summary of the Bird Species Seized in the Illegal Trade in Rio de Janeiro, Brazil .....	33
4. Capítulo – Prevalência de Enterobacteriaceae em aves silvestres e seu potencial zoonótico .....	43
Artigo - Prevalence of zoonotic bacteria among wild birds from the illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health .....	43
5. Capítulo – Perfil molecular de <i>Salmonella</i> isoladas em aves apreendidas no tráfico de animais silvestres no Rio de Janeiro .....	61
Artigo - Isolation of <i>Salmonella</i> in wild birds from wildlife illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health .....	61
6. Capítulo - Vibrionaceae e Aeromonadaceae em aves silvestres apreendidas no comércio ilegal .....	74
Artigo - Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds from the illegal wildlife trade in Rio de Janeiro .....	74
7. Capítulo – Presença de <i>Staphylococcus</i> isolados em aves silvestres no Rio de Janeiro .....	82
Artigo - <i>Staphylococcus</i> isolados em aves silvestres no Rio de Janeiro, Brasil - relevância para a Saúde Pública .....	82
8. Discussão .....	101
9. Considerações Finais .....	106
10. Referências Bibliográficas .....	109
Anexo 1. Aves silvestres que tiveram material biológico coletado durante o período de	

estudo .....	123
Anexo 2. Ficha de controle individual contendo dados do espécime em questão. ....	125
Anexo 3. Autorização do ICMBio para coleta de amostras de animais da fauna silvestre nativa com a finalidade de pesquisa científica. ....	127
Anexo 4. Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ. .....	131

## 1. Capítulo

### Contextualização

O Brasil pode ser considerado um dos países mais ricos em biodiversidade (Mittermeier et al. 2005), com a identificação estimada até o momento em seu território, de 10 a 12% de toda a diversidade biológica conhecida no planeta (Machado et al. 2008). Somente em relação à avifauna são mais de 1800 espécies, das quais mais de 10% são endêmicas (Efe et al. 2006; Sigrist 2006; Alves et al. 2010; CBRO 2011; Fernandes-Ferreira et al. 2012) e outros 10% estão ameaçadas de extinção (Marini & Garcia 2005). Esses animais sempre despertaram o interesse do ser humano devido ao exotismo de suas cores e pelo seu canto. No Brasil muitos eram utilizados por indígenas como animais de companhia e já no período da colonização, o tráfico de animais da nossa fauna era uma importante atividade econômica (Dean 1994; Sick 1997).

Após a perda de habitat, a caça e captura são as principais ameaças à sobrevivência de muitas espécies, o que pode alterar significativamente os processos ecológicos dos ecossistemas (Redford 1992). O comércio ilegal ou tráfico de animais silvestres é uma atividade altamente lucrativa, e considerada a terceira maior atividade de comércio ilícito no mundo, perdendo apenas para o tráfico de armas e drogas (Lima 2007). Dados indicam que esta atividade movimentava anualmente no mundo de 10 a 20 bilhões de dólares, e o Brasil contribuiu com cerca de 10% deste montante, o que corresponderia à retirada anual de até 38 milhões de animais de seus habitats (Ferreira & Glock 2004; Lima 2007; Ribeiro & Silva 2007).

No País, a partir de 1998 com a promulgação da Lei Federal nº 9.605, são considerados crimes ambientais contra a fauna matar, perseguir, caçar, apanhar e utilizar espécimes da fauna silvestre nativa sem autorização da autoridade competente, assim como vender, expor à venda, exportar, adquirir, guardar ou manter em cativeiro qualquer animal silvestre (Brasil 1998).

Dentre as consequências decorrentes desta atividade ilícita está o risco de transmissão de doenças entre diferentes espécies e de zoonoses (Chomel et al. 2007; Alves et al. 2010; Fernandes-Ferreira et al. 2012). O comércio global de animais selvagens favorece o mecanismo de transmissão de doenças que causam não somente surtos em seres humanos, mas ameaçam os animais de produção, o comércio internacional, os meios de subsistência no campo, as populações nativas de animais e a

própria saúde dos ecossistemas (Karesh et al. 2005). A maioria das doenças infecciosas emergentes são zoonoses e a fauna selvagem constitui um amplo e desconhecido reservatório. Fatores como a perda de habitat, o comércio e translocação de animais selvagens, o consumo de carne de caça, o desenvolvimento do ecoturismo e a aquisição de animais exóticos, como animais de companhia, assim como o desenvolvimento de melhores técnicas de diagnóstico, favorecem o aparecimento de zoonoses emergentes (Chomel et al. 2007). As aves silvestres, particularmente, correspondem a cerca de 90% dos animais apreendidos, e podem servir de reservatórios ou vetores mecânicos de inúmeros agentes causadores de zoonoses emergentes (Reed et al. 2003; Tsiodras et al. 2008).

## 1.1. Revisão de literatura

### 1.1.1. *O tráfico de animais selvagens*

O tráfico de animais silvestres é uma atividade que está intimamente ligada com a própria história do Brasil. Pode ser considerada verdadeiramente como a primeira atividade econômica da terra recém-descoberta, antes mesmo do valorizado pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) (Dean 1996; Bueno 1998; Marcondes 2005). Não por acaso, a região que viria a ser o território brasileiro, durante cerca de três anos, era referida nos mapas como Terra dos Papagaios, devido à abundância dessas aves (Sick 1997; Bueno 1998). Durante o primeiro contato com a expedição de Pedro Álvares Cabral, os indígenas ofereceram dentre outras mercadorias, pássaros canoros, papagaios, araras e macacos. Os tupis capturavam animais vivos ou forneciam peles para os europeus. O manifesto de carga da nau Bretoa de 1511, além da carga de pau-brasil, registra 23 periquitos, 16 felinos, 19 macacos e 15 papagaios; já o navio Pelerine de 1532, três mil peles de “leopardo”, 300 macacos e 600 papagaios. Esses números nos dão uma estimativa do quanto se perdeu em biodiversidade e quantas espécies podem ter sido extintas sem sequer terem sido descritas pela ciência (Bueno 1998).

Diversas são as citações de viajantes da época sobre os altos valores que nossos animais atingiam nas cortes européias, especialmente as aves, por sua diversidade de espécies e variedade de cores das plumagens (Sick 1997; Bueno 1998). Interessante é o destino funesto que a carga do navio no qual o francês Jean de Léry retornava à pátria,

como o próprio relatou: “Não obstante a fome, durante a qual, como já disse, foram comidos todos os bugios e papagaios que trazíamos, guardara eu até então uma dessas aves, grande como um pato, bom falador e de linda plumagem, porque desejava com ela presentear ao senhor almirante; mas mal foi a necessidade, que não pude conservá-la mais tempo e teve a mesma sorte das outras” (Hue 2008).

Desde os primórdios da colonização, era comum o hábito de criar aves em casa. Os papagaios, em especial, eram bastante valorizados pela capacidade de falar português, francês e tupi. Serviam como símbolos de status, sendo as mais raras e caras como a Ararajuba (*Guarouba guarouba*) encontrada somente na casa dos nobres mais poderosos, como relata o padre jesuíta Fernão Cardim. Ainda segundo o religioso, os índios alimentavam o próspero comércio de aves, chegando a dar duas a três pessoas como escravos em troca de um quereiuá (*Cotinga maculata*). As coloridas penas eram valorizadas não só pelos índios, mas pelo mercado europeu onde eram usadas para enfeitar os chapéus da nobreza e dos poderosos (Bueno 1998). A própria Imperatriz Leopoldina, já no Século XIX, era uma colecionadora de espécies da flora e fauna brasileiras, tendo enviado minerais, plantas e animais de várias espécies para Europa, principalmente para o Museu de História Natural de Viena. D. Pedro II, apesar de tomar algumas iniciativas visando à preservação dos mananciais hídricos da cidade do Rio de Janeiro, como o reflorestamento da Floresta da Tijuca, possuía uma murça, traje de gala, feita de penas amarelas do peito de centenas de tucanos (Schwarcz 1998).

No início do século XIX existia na cidade do Rio de Janeiro um comércio exportador de couros e peles de onça, veado, lontra, cutia, paca, cobras, jacarés, focas e outros animais, além de penas e plumas e carapaças de tartarugas. Talvez seja esta a origem das atuais feiras livres. Já no começo da industrialização do país a caça e captura de animais selvagens para o comércio encontravam um importante mercado interno. As aves canoras eram bastante populares, e raras eram as feiras que não tinham vendedores de pássaros e as famílias que não possuíssem uma gaiola pendurada na janela. Este hábito, profundamente arraigado na cultura popular, pode ser observado tanto no interior rural como nos grandes centros urbanos, e em todos os estratos sociais (Dean 1996; Marcondes 2005).

Atualmente, o tráfico da fauna selvagem é estruturado na forma de uma organização criminosa, que inclui influências e relações político-econômicas, corrupção nas diversas esferas dos órgãos responsáveis por reprimi-lo, estrutura hierárquica e

ligação com outras atividades como o tráfico de drogas (Le Duc 1996; RENCTAS 2001; Hernandez & Carvalho 2006). Estatísticas do comércio global indicam que esta é uma indústria multimilionária que ameaça a biodiversidade, aumentando o risco potencial da introdução de espécies invasoras e da propagação de doenças. Em todo o mundo, estimativas indicam o comércio anual de 40.000 primatas, 4 milhões de aves, 640.000 répteis e 350 milhões de peixes tropicais, movimentando US \$6 bilhões na indústria (Chomel et al. 2007; Rosen & Smith 2010).

A maioria dos animais que alimentam esta rede criminosa é coletada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste, e são escoados para grandes centros das regiões Sul e Sudeste, principalmente para os estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Nestes locais, encontram consumidores em potencial, que suprem o mercado interno (Figura 1). Outros animais são exportados através de portos e aeroportos, principalmente para os Estados Unidos, Europa e Ásia (Lima 2007; Ribeiro & Silva 2007; Alves et al. 2012). No estado do Rio de Janeiro, espécimes da fauna brasileira são comercializados em centenas de feiras que acontecem principalmente aos finais de semana, com destaque para as conhecidas Feira de Honório Gurgel, no município do Rio de Janeiro e para a Feira de Caxias, no município de Duque de Caxias, na Região da Baixada Fluminense (Carvalho 1985; Lopes 1991; Lima 2007).



Figura 1. Representação das principais rotas do tráfico de animais silvestres. Fonte: RENCTAS 2013.

A cadeia social que sustenta o tráfico da fauna silvestre se mostra bastante complexa. Os fornecedores são geralmente pessoas de baixa renda, que em geral habitam o interior do país e têm na atividade de caça e coleta de animais uma fonte de renda complementar, repassando os espécimes coletados aos intermediários por preços irrisórios. Estes são responsáveis por levar a “mercadoria” para os centros urbanos. São caminhoneiros, motoristas de ônibus, ambulantes, que os comercializam para traficantes de pequeno e médio porte (intermediários secundários). Estes por sua vez, fazem a conexão com os grandes traficantes. São estes grandes comerciantes os responsáveis pelo contrabando nacional e internacional, envolvendo uma rede altamente especializada, que inclui proprietários de criadouros, empresários e agentes do Estado. Por fim, o ciclo é completado com os consumidores, cidadãos comuns interessados em possuir um espécime silvestre como animal de estimação, colecionadores particulares, criadouros, indústrias farmacêuticas e atividades ligadas à moda (Hernandez & Carvalho 2006; Lima 2007; Alves et al. 2010; Alves et al. 2012).

Além disso, o comércio ilegal de animais silvestres, recentemente, ganhou um novo aliado – a internet. Muitos websites oferecem a venda de espécies silvestres brasileiras com documentações falsas que indicariam a legalização dos animais (Alves et al. 2012).

### *1.1.2. Perfil da fauna traficada*

Pesquisas indicam que, da fauna silvestre apreendida junto ao comércio ilegal, de 82 a 90 % correspondem ao grupo das aves. O restante está dividido entre répteis e mamíferos (Lopes 1991; Efe et al. 2006; Ribeiro & Silva 2007; Godoy & Matushima 2010; Alves et al. 2012). Segundo alguns pesquisadores (Ferreira & Glock 2004; Efe et al. 2006; Alves et al. 2010; Godoy & Matushima 2010; Fernandes-Ferreira et al. 2012), os Passeriformes, especialmente da família Emberizidae e Thraupidae, seguidos pelos Psittaciformes são as aves mais frequentemente capturadas. Estudos em diversas regiões do país, avaliando as principais espécies expostas à venda no comércio ilegal, apontam para um quadro semelhante. Táxons como o Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) e Coleiros (*Sporophila* spp.) estão entre os mais comuns em diversos pontos de comércio ilegal no país, como no Rio Grande do Sul (Ferreira & Glock 2004), em Goiás (Bastos et al. 2008), em Pernambuco (Pereira & Brito 2005; Regueira & Bernard 2012), na

Paraíba (Gama & Sassi 2008; Alves et al. 2010; Barbosa et al. 2010) e no Ceará (Fernandes-Ferreira et al. 2012), com algumas variações regionais.

No estado do Rio de Janeiro, durante o ano de 2003, foram recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS-RJ) 4.600 animais, dos quais as aves silvestres corresponderam a cerca de 90% das apreensões. Deste grupo, os mais frequentes foram os passeriformes (84%) e os psitacíformes (4%) (Bezerra et al. 2004a). Resultados semelhantes foram descritos por Matias et al. (2012) avaliando o perfil da avifauna apreendida no comércio ilegal durante o ano de 2011, sendo que as famílias Emberizidae e Thraupidae corresponderam a quase 90% das aves, sendo Coleiro (*Sporophila* spp.) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) os táxons mais comuns.

### 1.1.3. O risco da transmissão de doenças

Doenças emergentes e reemergentes são consequência de diversos fatores tais como a interação entre animais selvagens e domésticos, bem como de populações humanas. O surgimento de uma enfermidade decorre, provavelmente, de mudanças na ecologia do hospedeiro, do patógeno ou de ambos. O crescimento da densidade de populações humanas, a expansão de áreas urbanas e da agropecuária levando ao desmatamento e à perda de habitat de espécies selvagens e ao contato do homem com regiões até então inacessíveis, propicia um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, o que aumenta o contato com reservatórios silvestres e leva ao surgimento ou recrudescimento de zoonoses. Com a diminuição das distâncias em decorrência da globalização e o aumento da migração de populações associadas com a urbanização, epidemias locais podem se tornar pandemias rapidamente, constituindo ameaça à saúde pública e à conservação da biodiversidade (Daszak et al. 2000; Daszak & Cunningham 2002). A globalização teve um impacto no comércio mundial de animais, o que aumentou o potencial de translocação de zoonoses e o risco para a saúde humana e animal (Marano et al. 2007).

A epidemiologia das zoonoses vem ganhando espaço e importância na Saúde Pública, com o aumento da interface entre o habitat de animais selvagens com o homem e seus animais domésticos, levando ao surgimento de novas doenças. Vias de exposição ambiental vêm sendo identificadas, com a melhoria dos serviços de vigilância de doenças de origem alimentar. Embora a contaminação fecal de alimentos seja uma

importante via de transmissão de zoonoses, na maioria das vezes a origem da contaminação não é determinada. Conseqüentemente, reservatórios ambientais de microorganismos de importância para a Saúde Pública necessitam ser investigados (Cole et al. 2005).

Dentre as conseqüências do tráfico de animais silvestres podem-se considerar as perdas econômicas e sociais, pois a movimentação financeira acarretada pela atividade, como é ilegal, não é arrecadada pelo Estado. Além disso, ocorrem perdas econômicas ocasionadas pelo desequilíbrio ecológico gerados nos ecossistemas; as perdas ecológicas por causa da exploração insustentável da fauna, promovendo extinções locais, regionais ou globais; e ainda o risco de transmissão de doenças e zoonoses, pois não há nenhum controle sanitário e muitas espécies que nunca entrariam em contato na natureza ficam expostas a transmissões de patógenos no cativeiro (RENCTAS 2001; Fernandes-Ferreira et al. 2012). Surtos de doenças resultantes do comércio de animais selvagens têm causado perdas econômicas na faixa de centenas de bilhões de dólares em todo o mundo (Karesh et al. 2005).

A maioria das doenças infecciosas são zoonoses e as espécies da fauna silvestre podem estar envolvidas na sua epidemiologia, podendo servir como principais reservatórios destas enfermidades para animais domésticos e para o homem, representando um problema importante na esfera da saúde pública (Kruse et al. 2004; Tsiodras et al. 2008). Em 2001, 62% dos patógenos humanos foram catalogados como zoonoses e representam a grande maioria das doenças infecciosas emergentes (Kruse et al. 2004; Karesh et al. 2005; Chomel et al. 2007; Pavlin et al. 2009). Muitos patógenos possuem variados mecanismos de transmissão e diversos fatores influenciam na epidemiologia dessas enfermidades. A principal causa da emergência dessas enfermidades no homem é o fato deste alterar os ambientes naturais, se aproximando das espécies silvestres. Isso inclui o comércio desses animais e a sua manutenção como animais de companhia (Chomel et al. 2007; Tsiodras et al. 2008).

As zoonoses transmitidas por reservatórios silvestres podem apresentar variados mecanismos de transmissão. O trânsito de patógenos, vetores ou reservatórios também pode influenciar a epidemiologia dessas doenças. Essa movimentação pode ocorrer de forma natural, como no caso das aves migratórias, ou pela intervenção humana, como no caso de viagens aéreas e do tráfico de animais silvestres. Alterações ou adaptações do próprio microorganismo podem influenciar na epidemiologia das zoonoses que

envolvem espécies silvestres, como nos casos de conjugação, transformação e transdução de bactérias. A transmissão de microorganismos alterados ou adaptados geneticamente dos animais silvestres para o homem pode ocorrer diretamente ou indiretamente através dos animais domésticos. O tráfico de animais silvestres favorece esse contato, aproximando espécies silvestres, domésticas e o homem (Kruse et al. 2004).

O comércio de animais silvestres propicia a transmissão de doenças infecciosas, que pode originar surtos não somente no homem, mas em animais de produção, ameaçar o comércio, as populações e animais em vida livre e a própria saúde dos ecossistemas (Karesh et al. 2005; Chomel et al. 2007). Dados identificados a partir do comércio formal indicam esse risco pelos exemplos da introdução de Monkeypox vírus nos EUA por roedores importados da África, e da disseminação do fungo da Chitridiomycose em anfíbios pela importação da Rã-touro (*Rana catesbeiana*) (Rosen & Smith 2010). Animais silvestres mantidos como animais de companhia foram associados a surtos de zoonoses no homem, envolvendo infecções por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *Coxiella burnetti* (Chomel et al. 2007).

Pessoas envolvidas no comércio ilegal de animais, desde caçadores, traficantes e consumidores, mantêm contato com espécimes silvestres em algum momento. Espécies silvestres distintas mantêm contato enquanto estão expostas a venda, assim como com espécies domésticas que são vendidas nos mesmos mercados de rua (Karesh et al. 2005).

Os animais apreendidos oriundos do comércio ilegal, normalmente estão em condições precárias, alojados em locais sem ventilação, em altas concentrações e com oferta de alimentos inadequada, o que resulta numa elevada taxa de mortalidade. As aves sobreviventes frequentemente desenvolvem doenças causadas por agentes etiológicos que podem estar presentes de forma subclínica. Desta forma, podem se tornar reservatórios e disseminar agentes patogênicos na natureza caso o processo de soltura não passe por um rígido controle sanitário. Apesar da diversidade de infecções que pode acometer os animais silvestres apreendidos, estas quase nunca são selecionados para o isolamento de patógenos, tornando-se impossível avaliar o verdadeiro risco de transmissão pelo comércio ilegal de animais silvestres (Rosen & Smith 2010). Os riscos para a biodiversidade e para a saúde pública devem ser levados

em consideração nos projetos de translocação e reintrodução de espécies silvestres em seu habitats naturais (Godoy & Matushima 2010).

A regulamentação do comércio de espécies silvestres e a tentativa de coibir o comércio ilegal diminuiriam o risco de transmissão de zoonoses entre o homem, os animais domésticos, silvestres e para o sua disseminação nos ecossistemas (Karesh et al. 2005). Programas de vigilância e monitoramento são importantes para entender o status de saúde de populações de vida livre, assim como dos ecossistemas em que vivem. Isso inclui o manejo de populações, o controle do comércio e de translocações e a proteção da biodiversidade, fazendo com que eventos de mortalidade e epizootias sejam detectados, salvaguardando desta maneira a saúde pública (Mörner et al. 2002; Chomel et al. 2007).

#### *1.1.4. Patógenos bacterianos em aves silvestres e seu potencial zoonótico*

As aves são susceptíveis a diversos patógenos bacterianos comuns ao homem e aos animais domésticos, além de outros microorganismos com potencial patogênico, como protozoários e vírus. Estudos envolvendo a microbiota de aves silvestres são raros ou limitados a um pequeno número de animais, e aqueles envolvendo a prevalência de enterobactérias se limitam a alguns grupos como as gaivotas, sendo *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp., os agentes etiológicos de interesse. A maioria dos estudos envolvendo passeriformes ocorrem a partir de surtos com alta mortalidade, não fornecendo informações acerca da prevalência em animais aparentemente saudáveis. Com isso, o papel dessas aves como vetores de patógenos bacterianos, pode estar subestimado (Kruse et al. 2004; Benskin et al. 2009).

Apesar disso, estes animais têm sido incriminados como responsáveis pela transmissão indireta de patógenos bacterianos da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli* e *Salmonella* sor. Typhimurium, causando infecções em seres humanos. Infecções por *Staphylococcus*, por espécies das famílias Vibrionaceae como *Vibrio cholerae* e Aeromonadaceae como *Aeromonas* spp, também representam potencial teórico de transmissão de doenças das aves para o homem (Tsiodras et al. 2008).

Alguns estudos têm revelado a fauna entérica de aves, como o de Steele et al. (2005) que isolou pelo menos 25 espécies de bactérias em aves marinhas, incluindo algumas cepas de *Escherichia coli*, assim como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*, que podem apresentar potencial patogênico, tornando-se oportunistas. Cepas enteropatogênicas de *E. coli* como O157:H7 têm sido isoladas de aves selvagens saudáveis e doentes, sugerindo que estes animais possam ser carreadores de cepas resistentes a antibióticos (Hubálek 2004). Outras pesquisas, como as de Brittingham et al. (1988) e Gopee et al. (2000), também isolaram *E. coli* de aves selvagens.

Refsum et al. (2003), estudando casos de salmonelose em pássaros na Noruega, indicam que locais onde as pessoas oferecem alimento às aves têm importante papel na epidemiologia da doença e que aves portadoras constituem fonte de infecção, causando casos esporádicos e epizootias locais. O entendimento da disseminação de patógenos bacterianos por estas espécies animais pode servir de modelo para o conhecimento quanto à disseminação de outros microorganismos. Contudo são escassas as informações acerca da microbiota bacteriana gastrointestinal da maioria das espécies selvagens, com poucos estudos, tendo em vista que estes se encontram concentrados em espécies de interesse comercial (Benskin et al. 2009). Adicionalmente, é necessário esclarecer seu real papel na disseminação da resistência antimicrobiana, problema de reconhecida emergência em todo o mundo, tendo em vista que o uso destas drogas na medicina humana e veterinária, na perspectiva atual de globalização, representam fatores para sua disseminação (Sayah et al. 2005).

#### 1.1.4.1. Infecções por bactérias da família *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família Enterobacteriaceae representam um grupo heterogêneo de bacilos entéricos, não formadores de esporos, Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, fermentadores de glicose e outros açúcares, geralmente com produção de gás, catalase positivos e oxidase negativos. Habitam ou produzem doença no trato digestivo de animais de sangue quente, inclusive no homem. Inclui bactérias autóctones que habitam normalmente o trato intestinal e outras altamente patogênicas com potencial de colonização e produção de doença (Smith 1984; Farmer et al. 2007). Nas aves, inclusive nas espécies marinhas, diferentes patologias especialmente dos tratos

gastrointestinal e respiratório envolvem enterobactérias tais como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* e *Yersinia* spp., que também podem acometer os mamíferos (Dorrestein 1996; Steele et al. 2005).

No homem, a salmonelose é bastante comum, ocorrendo em casos esporádicos ou na forma de surtos que afetam milhares de pessoas. Causa infecção intestinal com sintomas de febre, mialgia, cefaléia, mal estar, dor abdominal, náuseas, vômito e diarreia, que normalmente tem um curso benigno. Crianças e idosos são particularmente susceptíveis a infecção por *Salmonella* (Acha & Szyfres 2003; Strohl et al. 2004). Diversos sorovares de *Salmonella* são isolados de aves silvestres aparentemente saudáveis, assim como de indivíduos doentes. O principal sorovar isolado é *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, especialmente em passeriformes e anseriformes (Benskin et al. 2009). Nos Estados Unidos, são estimados anualmente 1,4 milhões de casos de salmonelose, com cerca de 600 mortes. *S.* sor. Typhimurium pode provocar doença no homem e nos animais, sendo que a maioria dos casos humanos são relacionados à ingestão de alimentos contaminados. Porém, outros tipos de mecanismos de transmissão podem ocorrer, como pelo contato com animais, com a água e com o ambiente contaminado (Hendriksen et al. 2004). Muitos casos não são notificados e talvez seja a zoonose mais disseminada em todo o mundo. Os animais são os reservatórios deste microorganismo, tendo papel fundamental na epidemiologia da doença (Acha & Szyfres 2003).

Estudo conduzido nos Estados Unidos, de 1985 até 2004, demonstrou ser esta infecção causa significativa da mortalidade de diversas espécies de aves, especialmente as pertencentes à ordem Passeriforme, da qual foi responsável por 21,5% das mortes (Hall & Saito 2008). Refsum et al. (2003) descreveram surto de salmonelose por *S.* sor. Typhimurium em passeriformes na Noruega nos anos de 1999 e 2000. Segundo Guimarães (2006), os pássaros podem representar fontes de infecção para outras aves, mamíferos e seres humanos. Surtos de *Salmonella* podem levar ao aparecimento de aves moribundas ou causar mortes súbitas. Aquelas que se recuperam podem permanecer como portadoras por período variável. Sabe-se que a disseminação, inclusive de espécies bacterianas, de áreas remotas para diferentes centros é facilitada pela estrutura que fomenta o tráfico de animais silvestres, visto que muitos espécimes são capturados em diversas regiões do país e vendidos nos grandes centros urbanos.

Vários fatores irão determinar a severidade e a manifestação da salmonelose em aves. A capacidade de resposta do sistema imune da ave dependerá do sorovar envolvido, da idade do animal, da existência de coinfeções, do estado nutricional, do manejo sanitário e do nível de estresse a que está submetida, o que poderá aumentar o risco de severidade e de casos fatais. Alguns sorovares como *Salmonella* sor. Typhimurium e *S. sor. Enteritidis* estão mais envolvidos em casos de doença nas aves e no homem. *Salmonella* tem potencial para infectar diversos órgãos dos sistemas respiratório, gastrointestinal, renal, neurológico, cardiovascular e reprodutivo. Pássaros silvestres doentes ou assintomáticos têm sido descritos como carreadores de *Salmonella* spp. e envolvidos na transmissão da bactéria para o homem e outros mamíferos. Infecção por *S. sor. Typhimurium* em passeriformes pode se apresentar assintomática ou com o microorganismo preservado em granulomas em diferentes órgãos como fígado, baço, ceco ou tecido ósseo. A salmonelose no homem ocorre mais frequentemente através da transmissão alimentar ou ainda, pelo contato com répteis, anfíbios ou aves silvestres criadas como animais de companhia. É transmitida mais comumente por via fecal-oral, mas pode ocorrer pelo contato com animais ou pessoas infectadas (Evans 2011).

*Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são comumente isoladas na microbiota de aves e normalmente não causam doença, sendo consideradas patógenos oportunistas. Da mesma forma, *Escherichia coli* é considerada comensal nos animais, fazendo parte de sua microbiota normal e contribuindo na produção de substâncias antibacterianas, para a nutrição e tendo ainda função imunomoduladora. Em algumas situações é capaz de causar uma variedade de doenças, incluindo disenteria, a síndrome urêmica hemolítica, infecções renais e na bexiga, septicemia, pneumonia e meningite, no homem e nos animais. Apesar de algumas cepas permanecerem de forma simbiótica no trato gastrointestinal, algumas possuem marcadores de virulência que podem determinar uma variedade de infecções extraintestinais (Gopee et al. 2000). *E. coli* produtora de citotoxinas tem sido isolada de pássaros e podem infectar o homem, causando infecções extraintestinais (Benskin et al. 2009).

Algumas cepas de *E. coli* são consideradas patógenos intestinais primários, causando gastroenterites e colites quando ingeridas em quantidade suficiente. Também chamadas de *E. coli* patogênica intestinal ou diarreiogênica, são classificadas em seis patotipos de acordo com os mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência, modos de adesão em culturas de células epiteliais e os sintomas clínicos que causam: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), shigatoxigênica (STEC),

dentre esta a enterohemorágica (EHEC), a enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e a difusamente aderente (DAEC) (Kaper et al. 2004).

As *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) são reconhecidas por provocar doença fora do trato gastrointestinal. As cepas uropatogênicas (UPEC) causam infecção no trato urinário e as cepas que causam septicemia estão associadas a meningite neonatal, podendo provocar infecções nos mais variados sítios (Kaper et al. 2004).

#### 1.1.4.2. Infecções por bactérias da família *Vibrionaceae*

Muitas espécies de *Vibrio* são potencialmente patogênicas para o homem e têm sido isoladas em infecções de origem alimentar. Fazem parte da microbiota de ambientes aquáticos e estuarinos, com salinidade variada, sendo as principais causadoras de enfermidades de peixes e crustáceos. Dentre as espécies, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* são as principais espécies patogênicas isoladas de águas salgadas; *Vibrio mimicus* e *Vibrio cholerae* são aquelas encontradas em água doce (Jayasinghe et al. 2008). *V. parahaemolyticus* apresenta uma distribuição global disperso no ambiente aquático e é importante agente patogênico de peixes e crustáceos (Pereira et al. 2007; Jayasinghe et al. 2008).

No contexto da Saúde Pública, as aves são importantes por poderem carrear agentes de zoonoses emergentes, seja como hospedeiros ou como carreadores de artrópodes infectados. É possível que as aves aquáticas possam ser responsáveis por disseminar *V. cholerae* entre os corpos d'água (Halpern et al. 2008).

#### 1.1.4.3. Infecções por bactérias da família *Aeromonadaceae*

A família *Aeromonadaceae* compreende um grupo de microorganismos distribuídos pelos ecossistemas aquáticos e muitos deles patogênicos para homens e animais. Podem causar lesões de pele nos animais, e no homem infecções gastrointestinais, provavelmente pelo contato com água e alimentos contaminados (Pereira et al. 2008). Alguns gêneros como *Aeromonas* spp., além de habitarem o ambiente aquático, podem ser encontrados no trato intestinal de répteis e de mamíferos marinhos, podendo desencadear processos infecciosos tanto nestes animais quanto no homem (Cubas et al. 2006; Pereira et al. 2008). *Aeromonas aeruginosa* afeta

principalmente o trato respiratório superior das aves, podendo causar ainda septicemia e hemorragia entérica em psitacídeos e mortalidade em outras espécies selvagens (Benskin et al. 2009). É considerada causadora de 13 % das gastroenterites diagnosticadas nos Estados Unidos (Kingombe et al. 1999; Cubas et al. 2006).

#### 1.1.4.4. Infecções por bactérias da família *Staphylococcaceae*

O trato gastrointestinal dos animais é composto por microbiota diversa, no qual as bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte. Este é constituído por diversas espécies de cocos Gram positivos que podem causar enfermidades graves nos animais, como a doença supurativa, mastite, artrite e infecções do trato urinário, as quais estão associadas a inúmeros fatores de virulência como produção de toxinas extracelulares e enzimas (Duarte et al. 2004; Coelho et al. 2007).

O isolamento de *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus*, é relativamente comum em aves domésticas e infecções estão associadas a imunodeficiência do hospedeiro, sendo um agente oportunista. Pode provocar artrite, tendinite e septicemia (Benskin et al. 2009). São reconhecidos os grupos *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* e espécies *Staphylococcus* coagulase-negativas, que representam maior potencial de patogenicidade. Compõem a microbiota normal de animais e do homem, o que facilita sua transmissão como zoonose e sua disseminação ambiental. Alguns estudos têm apontado sua emergência quanto à resistência aos antimicrobianos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos, amplamente disseminados em ambientes intra e extra hospitalares, constituindo um problema importante na Saúde Pública humana e veterinária e um desafio global, uma vez que as opções terapêuticas vêm gradativamente se tornando mais limitadas (Lubelchek & Weinstein 2008).

#### 1.1.5. Bactérias resistentes aos antimicrobianos em aves silvestres

O uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana, veterinária e em práticas agrícolas têm selecionado cepas resistentes de bactérias, com repercussões para a Saúde Pública (Álvarez-Fernández et al. 2012). Este problema global afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento e rapidamente pode se disseminar por meio de viagens internacionais (Okeke & Edelman 2001). Neste contexto, o seu monitoramento,

obtendo informações sobre sua magnitude e tendências se torna essencial para possíveis intervenções (Álvarez-Fernández et al. 2012).

O uso de antibióticos em animais com o objetivo de controlar infecções bacterianas e como promotores do crescimento pode resultar na seleção de cepas resistentes tanto de bactérias patogênicas quanto naquelas que fazem parte da microbiota normal, e é considerado o principal fator desencadeante do surgimento, seleção e disseminação de microorganismos resistentes aos antibióticos, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana (Benskin et al. 2009).

Pouco se sabe sobre os níveis de bactérias resistentes aos antibióticos associados aos animais selvagens e a ambientes que nunca foram expostos a esses medicamentos (Nascimento et al. 2003; Levy & Marshall 2004). Apesar dos animais selvagens não terem contato com antibióticos, podem ser infectados através da interação com outras aves que podem servir como vetores desses agentes, uma vez que o isolamento de bactérias resistentes tem sido descrito nesses animais, especialmente nas aves migratórias. Inclusive aquelas mantidas como animais de estimação podem ser reservatórios em potencial para a transferência de bactérias resistentes aos antibióticos. Além de se tornar um problema para conservação de populações de animais selvagens, a disseminação de cepas resistentes a antibióticos pode ter implicações para a Saúde Pública, as quais dependem da frequência de contato com o homem, com os animais de produção e com os alimentos (Okeke & Edelman 2001; Benskin et al. 2009).

A resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida de dois modos: através de mutações em genes pré-existentes ou adquiridos previamente, ou pela transferência horizontal de genes adquiridos de outras bactérias. Dependendo do antibiótico, ambos os mecanismos podem estar envolvidos (Levy & Marshall 2004; Boerlin & Reid-Smith 2008).

Bactérias com altas taxas de mutação ocorrem com frequência em populações naturais. Essas mutações podem aumentar em situações onde o microorganismo está submetido a novas pressões seletivas. Esse mecanismo tem um papel importante no surgimento de resistência a antibióticos como as fluoroquinolonas e os beta-lactâmicos. A concentração de antibióticos logo acima da concentração mínima inibitória (MIC) pode eliminar ou inibir bactérias susceptíveis, mas ao mesmo tempo, a presença de bactérias mutantes na população pode levar a sua sobrevivência e multiplicação. Essa faixa de concentração é conhecida como janela de seleção de mutante (*mutant selection*

*window* – MSW). Com isso, se define a concentração para prevenção de mutação, como sendo aquela capaz de impedir o crescimento de bactérias mutantes, o que muitas vezes pode exigir uma concentração tão alta que fica impossível implementá-la na prática clínica (Levy & Marshall 2004; Boerlin & Reid-Smith 2008).

Para a maioria dos antimicrobianos, a resistência ocorre mais devido à aquisição de novos genes de resistência do que por mutações espontâneas. A maioria desses genes é adquirida de organismos que vivem no ambiente. A sua transferência pode se dar em dois níveis: a nível intracelular podem se mover dentro do genoma, entre cromossomos e replicons, através de plasmídios e fagos. Transposons e integrons são a maioria dos elementos envolvidos nesses movimentos. Ocorre tanto a recombinação homóloga como a não homóloga; e a nível intercelular (disseminação horizontal), a transferência de genes de resistência ocorre de três formas: transformação (aquisição de DNA), transdução (transferência por bacteriófagos) e conjugação (transferência por plamídeos e outros elementos de conjugação). A transferência de genes e de elementos genéticos e de bactérias resistentes, sejam comensais ou patogênicas, entre diferentes hospedeiros e nichos ecológicos, é bastante complexa (Levy & Marshall 2004; Boerlin & Reid-Smith 2008).

Seja através de mutação ou da transferência horizontal de genes, o impacto da resistência antimicrobiana na saúde humana e animal é, em grande parte, função da sua disseminação na população bacteriana. A mutação pode ocorrer de forma simples por pressão de seleção, mas se esta pressão persiste, a disseminação ocorre de forma clonal. Em outros cenários, a chave para a disseminação global é a transferência horizontal de genes entre cepas ou espécies de bactérias, como no caso da disseminação de *bla*<sub>CMY-2</sub> em *Salmonella* e outras Enterobacteriaceae. Existem situações em que tanto a disseminação clonal quanto a global podem acontecer. A primeira pode ocorrer de forma mais rápida e direcionada por pressões seletivas e dessa forma as intervenções aconteceriam diretamente nos clones resistentes através da modificação da pressão seletiva dos antibióticos usados. A transferência horizontal de genes de resistência se torna importante especialmente quando ocorre entre reservatórios não patogênicos (*Escherichia coli* comensais) e patogênicos (*Salmonella*, *Shigella*) (Levy & Marshall 2004; Boerlin & Reid-Smith 2008).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos variam. Podem ocorrer por meio da produção de enzimas que atuam diretamente nos antibióticos, como no caso

das beta-lactamases que destroem penicilinas e cefalosporinas. Outros atuam no mecanismo como a droga é transportada, como no caso da bomba de efluxo de antibióticos que media a resistência a tetraciclina, ao cloranfenicol e as fluoroquinolonas. Existe ainda um mecanismo que altera o alvo intracelular de ligação do antibiótico, como os ribossomos, as enzimas intracelulares ou as proteínas envolvidas na replicação do DNA ou na síntese de parede celular. Com isso o antibiótico fica impedido de inibir uma função vital na parede celular do microorganismo (Levy & Marshall 2004).

Evidências clínicas e epidemiológicas podem ser usadas para avaliar a transferência de microorganismos resistentes aos antibióticos entre localidades. Quando cepas causadoras de infecções mostram padrões de resistência atípicos, isso pode indicar a transmissão de bactérias resistentes a partir de outra região (Okeke & Edelman 2001). Microorganismos comensais podem conter plasmídeos, transposons e genes envolvidos na resistência antimicrobiana (Levy & Marshall 2004). A utilização das aves como sentinelas da disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente poderia indicar a sua prevalência no homem (Hasan et al. 2012).

#### *1.1.6. Susceptibilidade das aves silvestres as infecções bacterianas*

As aves silvestres estão vulneráveis a infecções bacterianas em diversas fases de seu ciclo de vida. Desde o momento em que ainda estão protegidas pela casca do ovo, pois bactérias podem penetrá-la e promover infecções, até após o nascimento, quando bactérias do ambiente podem ser introduzidas na ninhada pelos pais ou nos períodos reprodutivos, e em espécies que vivem em colônias, onde o contato entre as aves é maior e a densidade aumenta em certos períodos. A transmissão de agentes bacterianos pode ocorrer tanto através do contato direto entre indivíduos ou pela ingestão de alimento ou água contaminados. Tanto aves aparentemente saudáveis, carreadoras de uma menor proporção de patógenos em potencial, quanto indivíduos doentes podem servir de fontes de infecção (Benskin et al. 2009).

Situações que resultam numa maior densidade de aves silvestres propiciam uma maior interação entre indivíduos e uma maior disputa por recursos alimentares. Isso pode ocorrer tanto na criação de aves domésticas quanto em populações naturais de espécies selvagens. Agressões e o estresse resultante dessa competição podem levar

uma queda no sistema imunológico pelo aumento dos níveis de corticosteróides (Benskin et al. 2009).

Em diversos grupos de aves a exposição e susceptibilidade aos patógenos pode variar de acordo com o gênero. Normalmente a fêmea, durante o período reprodutivo fica mais exposta a bactérias gastrointestinais patogênicas durante a cópula e contato do produto de ejaculação com seu sistema reprodutivo. Em contrapartida, a resposta fisiológica às infecções pode variar, uma vez que os machos apresentam maiores níveis de testosterona durante o período reprodutivo, aumentando sua susceptibilidade a infecções. A competição por recursos durante períodos de escassez de alimentos pode influenciar a exposição a bactérias de origem alimentar, pois os machos tendem a dominar os recursos de melhor qualidade, fazendo com que as fêmeas e indivíduos submissos na escala hierárquica fiquem mais expostos a enteropatógenos. Ainda não está claro se o tamanho corporal influencia a susceptibilidade aos patógenos bacterianos, uma vez que aves maiores tendem a forragear mais e ter mais chance de ingerir alimentos contaminados (Benskin et al. 2009).

Alguns estudos indicam que aves jovens e indivíduos imaturos apresentam maior carga bacteriana do que os adultos. Naquelas espécies que reproduzem em colônias, os jovens estariam mais susceptíveis as infecções devido à maior densidade de aves e maior tempo de permanência no ninho que pode estar contaminado com material fecal. Além disso, a imunidade adquirida reduziria a susceptibilidade a infecções em indivíduos mais velhos (Benskin et al. 2009).

#### *1.1.7. Exposição das aves às enterobactérias*

O hábito alimentar parece ser o principal fator que influencia a exposição das aves silvestres às enterobactérias. No caso de aves de rapina e daquelas que se alimentam de carniça, há um maior nível de exposição a bactérias entéricas e a outros patógenos presentes no intestino de suas presas. Aquelas espécies que forrageiam no solo podem ingerir alimento contaminado de diversas formas pela via fecal-oral. Determinados grupos de aves, como as gaivotas, que interagem com o ambiente contaminado com resíduos humanos têm uma maior prevalência de enteropatógenos bacterianos (Benskin et al. 2009).

Alguns estudos apontam que aves que se alimentam em estações de alimentação improvisadas pelo homem, especialmente em países com o inverno mais rigoroso, estão mais susceptíveis a infecções por enterobactérias. Surtos envolvendo a mortalidade de passeriformes por listeriose, conjuntivite, salmonelose e infecção por *Staphylococcus*, têm sido descritos. Este ambiente propicia uma maior densidade dos animais e os pássaros doentes podem infectar outros indivíduos e contaminar os alimentos. Dessa forma, mesmo indivíduos aparentemente saudáveis podem servir de fontes de infecção para o homem e outras espécies animais (Refsum et al. 2003; Hall & Saito 2008; Benskin et al. 2009).

Grupos de aves que se alimentam em locais de despejo de esgoto e lixo humano podem carrear enteropatógenos. A frequência de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Campylobacter* spp. nas fezes de gaivotas (*Larus* spp.) e pombos apontam para a possibilidade desses animais carream estas bactérias, contaminando ambientes e servindo de fonte de infecção para o homem. A contaminação ambiental pode fazer com que as aves selvagens sejam vetores de enterobactérias para os animais domésticos, contaminando pastagens, a água e outras fontes de alimento (Benskin et al. 2009).

#### *1.1.8. Destinação da fauna apreendida e a importância do controle sanitário*

Um dos problemas decorrentes da apreensão de numeroso contingente de animais selvagens oriundos do comércio ilegal está na sua destinação, tendo em vista o controle sanitário necessário para prevenir a introdução de doenças nos centros de reabilitação e nos ecossistemas onde esses animais serão reintroduzidos. Segundo as diretrizes da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), todo animal selvagem deve passar por um protocolo de quarentena antes de qualquer procedimento de translocação ou soltura, de acordo com as recomendações estabelecidas para o grupo a que pertence (Woodford 2001). Recentemente, o Brasil (2008) vem seguindo essas diretrizes instituídas pela Instrução Normativa IBAMA 179/2008 que estabelece procedimentos para destinação dos animais da fauna silvestre nativa e exótica apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente aos órgãos competentes. Segundo a legislação, para o retorno à natureza, os espécimes em questão devem ocorrer naturalmente na área de soltura, não apresentar alterações comportamentais ou

problemas genéticos e passar por um período de quarentena onde são realizados diversos exames diagnósticos de acordo com a classificação taxonômica do animal.

No caso das aves, dentre a realização de diversos exames diagnósticos, é recomendada a realização de coletas de amostras clínicas por meio de *swab* visando o isolamento enteropatógenos, tais como de *Salmonella* spp. (Woodford 2001; Brasil, 2008).

No Estado do Rio de Janeiro o órgão responsável pelo manejo de animais silvestres apreendidos é o CETAS-RJ, localizado no município de Seropédica, cuja finalidade é receber, identificar, marcar, triar, avaliar, recuperar, reabilitar e destinar animais silvestres provenientes da ação da fiscalização, resgates ou entrega voluntária de particulares (Bezerra et al. 2004b).

## 1.2. Justificativa

Grande parte dos animais silvestres oriundos de apreensões no tráfico de animais que chegam ao CETAS não tem a sua origem conhecida. Seguindo as rotas do tráfico, muitas espécies apresentam distribuição geográfica ampla ou não ocorrem no estado do Rio de Janeiro, o que dificulta o seu retorno a natureza de acordo com as “Diretrizes e procedimentos para a soltura de espécimes da fauna silvestre nativa” da Instrução Normativa IBAMA nº 179/ 2008. Esta legislação preconiza ainda investigação clínica e diagnóstico dos animais a serem soltos, visando correto manejo sanitário e evitando a introdução de patógenos na natureza.

Do ponto de vista da Saúde Pública, as aves selvagens são importantes carreadoras de zoonoses emergentes (Halpern et al. 2008). O tráfico de animais silvestres possibilita a introdução de espécies exóticas, por meio da soltura deliberada ou escapes acidentais de cativeiros. Esta é uma das principais ameaças à perda de biodiversidade devido à competição por recursos alimentares e habitat, além do aparecimento de doenças e parasitas até então desconhecidos (Fernandes-Ferreira et al. 2012).

Profissionais ligados à Medicina da Conservação reconhecem a importância do monitoramento e do entendimento da ecologia de agentes infecciosos em animais selvagens e no ambiente, assim como o impacto que as doenças podem ter na

conservação de espécies e no planejamento das atividades de manejo (Munson & Karesh 2002).

Pessoas envolvidas na cadeia do tráfico de animais selvagens, assim como aquelas envolvidas no manejo dos animais, podem estar sujeitas a se infectarem por zoonoses. A influência de fatores ambientais na epidemiologia destas zoonoses, assim como para o risco de epizootias merecem um melhor entendimento.

### 1.3. Objetivos

#### *1.3.1. Objetivo Geral*

Avaliar o papel da avifauna silvestre apreendida no Estado do Rio de Janeiro, oriunda do comércio ilegal, como reservatórios de enteropatógenos das famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Staphylococcaceae e suas implicações para a Saúde Pública.

#### *1.3.2. Objetivos Específicos*

- I. Determinar a prevalência de enteropatógenos e de enterobactérias potencialmente patogênicas presentes nesta avifauna;
- II. Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência aos antimicrobianos nos isolados;
- III. Determinar, através da avaliação filogenética, o perfil clonal de enteropatógenos reconhecidos por seu potencial zoonótico e de saúde pública.

Espera-se propor procedimentos de quarentena e fluxograma de soltura, evitando possíveis epizootias em vida livre, além de propor medidas que minimizem o risco de transmissão de enteropatógenos entre as aves apreendidas e todos os envolvidos no seu manejo.

## 2. Capítulo

### Metodologia

#### 2.1. Local do estudo

O estudo foi conduzido no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS-RJ). Este órgão recebe não somente os animais provenientes do tráfico, mas também aqueles animais de vida livre vítimas de acidentes e que são resgatados, além de entregas voluntárias de cidadãos que mantinham animais silvestres em situação irregular.

#### 2.2. Seleção dos animais

Somente as aves confiscadas em pontos de comércio ilegal é que foram incluídas no estudo. Neste sentido, foram coletados materiais biológicos de aves silvestres oriundas do tráfico de animais selvagens, apreendidas pelo Batalhão de Polícia Florestal e de Meio Ambiente (BPFMA) da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro (PMERJ) em feiras de rua, onde os animais são expostos à venda. As aves em questão foram identificadas de acordo com a nomenclatura estabelecida pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO 2011).

#### 2.3. Coleta de dados nas aves silvestres

Durante o período de 20 de março de 2011 a 11 de março de 2012, foi realizado um estudo de prevalência de enteropatógenos das famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Staphylococcaceae, na avifauna silvestre apreendida pelo BPFMA no comércio ilegal. Num total de nove apreensões no período, foi coletado material biológico de 109 aves silvestres através de *swab* (tamanho padrão ou uretral dependendo do porte da ave), introduzidos na cloaca e rotacionados por aproximadamente 30 segundos. Para evitar que as aves se infectassem com algum microorganismo no próprio CETAS, a coleta foi realizada no mesmo dia da apreensão, antes de serem encaminhadas para o setor de quarentena. Por ser uma atividade ilegal, em cada fiscalização envolvendo o tráfico de animais silvestres a quantidade e as espécies animais a serem apreendidas se torna imprevisível. Além disso, as análises

microbiológicas a serem realizadas em laboratório não poderiam ultrapassar um determinado número de amostras por vez devido aos recursos humanos e materiais disponíveis. Sendo assim, a escolha dos animais foi realizada proporcionalmente de acordo com a diversidade de espécies por apreensão e independente do número de animais apreendidos, sendo o mínimo de nove e o máximo de 16 amostras por evento. Foram preenchidas fichas de controle individual contendo dados tais como a data de entrada e origem do animal, referentes a biologia da espécie, assim como uma análise do estado clínico no momento da apreensão (Anexo 1). Os animais foram observados por 48 horas para o registro da ocorrência de óbitos.

#### 2.4. Análise microbiológica

As amostras de material biológico animal obtidas a partir de *swab*, foram enviadas em meio de transporte Cary-Blair, ao Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/ FIOCRUZ) para realização da cultura e isolamento de bactérias da família Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Staphylococcaceae.

O material coletado foi semeado em meio de enriquecimento Caldo Nutriente (DIFCO), incubado a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas e nos meios de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis, incubado a 42<sup>0</sup>C *overnight*, Caldo Silliker e Tetrionato Muller-Kauffmann, incubados a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas. Após este período realizou-se o isolamento no meio Agar entérico Hektoen (OXOID) a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas. As colônias suspeitas (5-10) fermentadoras ou não de lactose foram repicadas para meio de triagem Costa e Vérnin. Testes bioquímicos foram realizados para o diagnóstico presuntivo de Enterobacteriaceae (Costa & Hofer 1972).

Para o diagnóstico de *Salmonella* spp., após a confirmação bioquímica pela metodologia descrita por Costa & Hofer (1972) através dos testes de produção de gás em meio de glicose, capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono em meio Citrato de Simmons (DIFCO), avaliação da motilidade, produção de gás sulfídrico e de indol em meio de SIM (DIFCO) e capacidade de descarboxilação do aminoácido lisina, foi realizado o diagnóstico antigênico conclusivo. As cepas foram então semeadas em ágar nutriente inclinado (DIFCO) e incubadas a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas para confirmação da estrutura antigênica através da técnica de soroaglutinação rápida em lâmina, com antissoros mono e polivalentes, somáticos (O) e flagelares (H), produzidos pelo LRNEB. A caracterização antigênica do sorovar específico foi realizada com base

no esquema sorológico de Kauffmann-White e Le Minor e representada de acordo com os critérios de Grimont & Weill (2007) e Guibourdenche et al. (2010). Todas as amostras isoladas de Enterobacteriaceae foram estocadas em tubos criogênicos de 5 mL contendo caldo BHI, para posterior caracterização do perfil de resistência antimicrobiana e avaliação molecular.

Paralelamente os espécimes foram semeados em Água Peptonada Alcalina - APA 1% NaCl, incubados a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas, com subsequente semeadura em Ágar TCBS (Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) e *Pseudomonas-Aeromonas* Selective Agar Base – GSP, incubados a 37<sup>0</sup>C por 24 horas. As colônias suspeitas (5-10) fermentadoras ou não de sacarose foram repicadas para meios de triagem (Kligler Iron Agar e Lysine Iron Agar) e Agar Nutriente acrescido de 1% NaCl. Em seguida foram realizados testes bioquímicos visando a identificação de Vibrionaceae e Aeromonadaceae. Após a seleção das cepas citocromo-oxidase positivas, foram realizados testes bioquímicos, baseados na resistência ao agente vibriostático O/ 129 (2,4 diamino-6, 7 diisopril-pteridina), produção de ONPG ( $\alpha$  nitrofenil- $\beta$ -D galactosidase), produção de acetoína em meio Voges-Proskauer, fermentação da glicose, sacarose, arabinose e manose e utilização dos aminoácidos lisina, ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase, a fim de obter a identificação conclusiva das cepas isoladas (FDA 1992).

Para o gênero *Staphylococcus*, as amostras foram semeadas em Caldo BHI, incubadas a 37<sup>0</sup>C por 18-24 horas e a seguir isoladas em Ágar Manitol Salgado sob as mesmas condições por 48 horas. Nas colônias suspeitas realizou-se o teste da catalase e a prova da coagulase, a fim de classificar os grupos em *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos e coagulase-negativos. Foram realizados testes bioquímicos complementares para caracterização das espécies, tais como a detecção de hemólise em ágar sangue, susceptibilidade a bacitracina e a novobiocina, produção de acetoína, urease, redução do nitrato, ornitina descarboxilase e fermentação de maltose, frutose, xilose, arabinose, rafinose e trealose (Koneman et al., 2008).

## 2.5. Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos

### 2.5.1. Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em todas as amostras de *Salmonella* spp. foi avaliada a susceptibilidade antimicrobiana através do Teste de Concentração Inibitória mínima (CIM). Esta avaliação se estendeu para a totalidade das cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp. Toda a análise foi realizada no LRNEB - IOC/ FIOCRUZ.

A CIM foi avaliada por microdiluição em caldo, com base na metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012). O método da microdiluição em caldo permite a avaliação da menor concentração de antimicrobiano (BIORAD<sup>®</sup>) capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, uma solução estoque dos antimicrobianos (0,1mg/mL, 1mg/mL e 10mg/mL) foi diluída em diferentes concentrações em caldo Mueller Hinton (OXOID), que variaram de 0,125µg/mL até 1024µg/mL. As soluções foram distribuídas em microplacas de 96 poços com um volume de 50µL/poço de acordo com a escala de diluição do antimicrobiano. As suspensões bacterianas crescidas por 24 horas a 37°C em caldo Mueller Hinton (OXOID), foram diluídas até 10<sup>-3</sup> em caldo Mueller Hinton (OXOID), a fim de obter-se uma concentração final de, aproximadamente, 10<sup>6</sup>UFC/mL da escala de Mc Farland. Para cada amostra, um volume de 50µL a suspensão bacteriana foi adicionada aos poços da micro placa contendo caldo Mueller Hinton (OXOID) e as concentrações distintas do antimicrobiano, sendo posteriormente incubadas a 35°C *overnight*. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que não apresentou turvação foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima para o antimicrobiano em estudo (CLSI, 2012). Para o controle na qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, foram utilizadas as cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC25922, *E. coli* ATCC35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923) testadas sob as mesmas condições de cultivo e incubação, de acordo com o CLSI.

### 2.5.2. Método de Difusão de Disco em Ágar

Em todas as amostras de *Staphylococcus* spp. foi avaliada a susceptibilidade antimicrobiana através do Método de Difusão de Disco em Ágar. Toda a análise foi realizada no LRNEB - IOC/ FIOCRUZ.

Para tal, foram utilizados os critérios preconizados pelo CLSI (2012), cujo procedimento incluiu o isolamento de quatro a seis colônias em Ágar Nutriente (DIFCO), sua inoculação em caldo Mueller Hinton (OXOID) e incubação a 37°C até atingir a turvação compatível com o tubo 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Com o auxílio de um swab esterilizado foi realizada uma semeadura contínua em induto utilizando inóculo padronizado através de espectrofotômetro (UNICO-1100 Spectrophotometer) para a obtenção da turbidez variável entre 0,008 a 0,010 de absorbância em comprimento de onda de 625nm. Em seguida foram aplicados com auxílio de um distribuidor (OXOID) e a leitura foi feita através de paquímetro. Para controle de qualidade da execução e confiabilidade dos resultados obtidos, cepas padrão foram testadas sob as mesmas condições de cultivo e incubadas (*Escherichia coli* ATCC25922; *E. coli* ATCC35218; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923).

### 2.5.3. Drogas antimicrobianas

Para o CIM realizado nas bactérias da família Enterobacteriaceae foram utilizados fármacos representativos das seguintes classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), fenicóis, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos, inibidores de folatos e nitrofuranos (Tabela 1). Para o Método de Difusão de Disco em Ágar realizado nos isolados de *Staphylococcus* spp. foram utilizados fármacos representativos das seguintes classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos e glicopeptídeos (Tabela 2).

O critério de escolha das drogas antimicrobianas teve por base aquelas empregadas sob o ponto de vista humano e veterinário e a orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS) quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana.

Tabela 1. Drogas antimicrobianas utilizadas na avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo Teste de Concentração Inibitória Mínima em cepas de Enterobacteriaceae.

ANTIMICROBIANOS		SIGLA
Fenicóis	Cloranfenicol	CHL
Beta-lactâmicos	Ampicilina	AMP
Penicilinas		
Cefalosporinas	Ceftriaxona	CRO
	Ceftiofur	CEF
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	NAL
	Ciprofloxacina	CIP
	Enrofloxacina	ENR
Tetraciclinas	Tetraciclina	TCY
Antifolatos	Sulfametoxazol/Trimetoprim	SXT
Nitrofuranos	Nitrofurantóina	NIT

Tabela 2. Drogas antimicrobianas utilizadas na avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo Método de Difusão de Disco em Ágar em cepas da família Staphylococaceae.

ANTIMICROBIANOS		SIGLA
Beta-lactâmicos	Ampicilina	AMP
Penicilinas		
Cefalosporinas	Oxacilina	OXA
	Cefoxitina	FOX
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP
Macrolídeos	Eritromicina	ERI
Lincosamidas	Clindamicina	CLI
Tetraciclina	Tetraciclina	TCY
Glicopeptídeos	Vancomicina	VAN

## 2.6. Caracterização molecular das amostras

### 2.6.1. Eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE)

A PFGE é a sigla usada para indicar qualquer técnica de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários (Magalhães et al. 2005).

Entre as cepas de enterobactérias isoladas, para avaliação quanto ao relacionamento clonal, foram selecionadas os isolados de *Salmonella* spp. a fim de avaliar a possível origem comum das mesmas, assim como se eram de origem humana, animal, alimentar ou ambiental. Para isso foi utilizado o banco de dados de cepas de *Salmonella* spp. do LRNEB - IOC/ FIOCRUZ. Como procedimento técnico primário foi empregado o protocolo do PulseNet ([www.cdc.gov/pulsenet](http://www.cdc.gov/pulsenet)) para preparo do DNA, digestão enzimática, condições de temperatura, ciclo, voltagem e tempo. O gel foi corado através de Brometo de Etídio (BrEt) e utilizado como marcador de PM, *S. Braenderup* H9812 com as informações após a digitalização da imagem inserida no banco de dados Biomechanics V, para análise do padrão de bandejamento.

### 2.6.2. Caracterização de genes de resistência

Para a caracterização dos genes de resistência foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Nesta etapa foram primariamente selecionadas cepas de *Salmonella* spp. que apresentaram resistência às cefalosporinas e quinolonas de última geração, empregadas no tratamento da salmonelose invasiva. Para a reação em cadeia da polimerase foram preparadas soluções de 25  $\mu$ L contendo 1,92  $\mu$ L de tampão; 0,98  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> e 2  $\mu$ L de mix de dNPT (Invitrogen, life Technology, Brasil), 1  $\mu$ L de cada iniciador, 0,25 $\mu$ L de Taq polimerase (Invitrogen), 17,25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O e 1 $\mu$ L do DNA.

A extração e quantificação do DNA foram realizadas utilizando Kit (QIAGEN). As sequências de nucleotídeos utilizadas como iniciadores para a detecção de cassetes gênicos codificantes de resistência foram aquelas descritas por Pitout et al. (2008) para quinolonas e Olesen et al. (2004) para beta-lactamases (Tabela 3). As amostras

bacterianas foram cultivadas em caldo Trypticase Soja TSB (MERCK) a 37°C por 18 horas. Alíquotas de 1,5 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 7.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado em recipiente de descarte e o sedimento ressuspenso em 180 µL de Buffer ATL. Foi acrescentado 20µL de proteinase K e misturado no vortex. Os tubos foram incubados em banho-maria a 55°C por uma hora. Foi adicionado 200µL do Buffer AL com homogeneização em Vortex. Os tubos foram incubados no banho-maria a 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200µL de etanol 100% à amostra com homogeneização em Vortex. A mistura foi transferida para uma coluna que possui uma membrana de sílica-gel, pelo qual o DNA possui afinidade. Estas colunas foram centrifugadas a 8.000rpm por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante retido no fundo do suporte e adicionou-se 500µL Buffer AW1, então a coluna mais uma vez foi centrifugada a 8.000 rpm por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante retido no fundo do suporte e adicionou-se 500µL do Buffer AW2, a coluna foi centrifugada a 12000rpm por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e a coluna foi inserida dentro de um eppendorf de 1,5mL, foi adicionado 200 µL Buffer AE e centrifugado a 8000 rpm por 2 minutos, o DNA purificado foi retido no tubo eppendorf. As amostras contendo o DNA amplificado foram analisadas em gel de agarose 1,0% (SIGMA). A corrida foi realizada em cuba horizontal de eletroforese (LOCCUS) a 90V/80min em tampão TBE (ROCHE). O gel foi corado com BrEt 0,1µL/mL por 15 minutos e imerso em 500mL de água destilada por 15 minutos, para retirar o excesso de brometo. Junto com as amostras foram inclusas o padrão de PM 100pb DNA ladder (SIGMA) e o controle positivo, já conhecido. No termociclador empregado foi adotado programa de amplificação cujas condições variaram de acordo com o gene de resistência. A visualização por UV com digitalização da imagem foi realizada por meio de sistema de fotodocumentação ImageQuant 300 após imersão do gel em solução a 5µg/mL de brometo de etídio, durante 10 minutos.

Tabela 3. Primers usados como indicadores na detecção de genes de resistência.

Gen	Sequences 5'-3'	Amplicon	References
<i>Bla<sub>cmv</sub></i>	F GACAGCCTCTTTTCTC	920pb	Olesen et al., 2004
	R TGGAACGAAGGCTAC		
QnrA	F ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516pb	
	R GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
PMQR	F ATTTCTCACGCCAGGATTTG	469pb	Pitout et al., 2008
	R ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
QnrS	F ACGACATTCGTCAACTGCAA	417pb	
	R TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
rrs	1 GGATTAGATACCCTGGTAGTCC	320pb	
	2 TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC		
<i>aac(3')IIa</i>	aacC2 F CGCTAAACTCCGTTACC	250pb	Diaz et al., 2004
	aacC2 R TAGCACTGAGCAAAGCC		
<i>aac(6')IB</i>	1 5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482pb	Park et al., 2006
	2 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
Integrase	1 CCTCCCGCACGATGATC	250pb	
	2 TCCACGCATCGTCAGGC		
Integron	3 AAGCAGACTTGACCTGA	500pb	
	5 GGCATCCAAGCAGCAAG		

---

Bla<sub>CTXm</sub> U1 ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC 593pb  
U2 TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG

---

### 2.6.3. Caracterização de genes de virulência em cepas de *Escherichia coli*

Foram selecionadas todas as cepas de *E. coli* isoladas, para identificação de genes marcadores de virulência, avaliadas por PCR Multiplex Multicoli, utilizado para triagem primária de enteropatógenos no LRNEB - IOC/ FIOCRUZ. Os seguintes genes foram investigados: *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *LT*, *ST*, *eagg* e *ipaH*.

### 2.7. Autorizações

O projeto de pesquisa foi submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), a fim de se obter autorização para coleta de amostras de animais da fauna silvestre nativa com a finalidade de pesquisa científica e obteve a licença número 26383-2 (Anexo 2). Além disso, foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, obtendo a licença LW-1/13 (Anexo 3).

### 3. Capítulo - Perfil da avifauna apreendida no comércio ilegal no Rio de Janeiro

#### Summary of the Bird Species Seized in the Illegal Trade in Rio de Janeiro, Brazil

*Artigo publicado na TRAFFIC Bulletin, volume 24, número 2. Páginas: 83-86 (2012)*

C.A.R. Matias, V.M. Oliveira, D.P. Rodrigues and S. Siciliano

#### Resumo

Resumo das espécies de aves silvestres apreendidas no comércio ilegal no Rio de Janeiro, Brasil - O Brasil é um dos países mais ricos em termos de biodiversidade, contendo em torno de 10 a 12% de todas as espécies conhecidas, incluindo mais de 1800 espécies de aves, sendo algumas endêmicas e grande parte ameaçadas. Após a perda de habitat, a captura e caça de animais silvestres é considerada a principal causa para o declínio de populações. Isso poderia afetar significativamente a dinâmica dos ecossistemas. Nos países neotropicais, animais selvagens são capturados para abastecer o tráfico nacional e internacional. Grande parte deste comércio é ilícito, mas pouco se sabe a respeito das consequências dessas atividades para a conservação das espécies. Estatísticas indicam que o Brasil contribui com pelo menos 10% do valor total do comércio ilegal de animais silvestres no mundo. Este trabalho destaca o comércio ilegal de aves silvestres no Rio de Janeiro baseado em fiscalizações feitas pelas autoridades locais e identifica quais são as espécies mais comumente apreendidas.

Brazil is one of the richest countries in the world in terms of its biodiversity (Mittermeier *et al.*, 2005), harbouring an estimated 10 to 12% of all known species (Machado *et al.*, 2008), including more than 1800 bird species, some endemic species (Efe *et al.*, 2006; Sigrist, 2006; Alves *et al.*, 2010; CBRO, 2011; Fernandes-Ferreira *et al.*, 2012) and a number that are considered threatened (Marini and Garcia, 2005). After habitat loss, poaching and hunting of wildlife are considered the most important causes of population declines, and could significantly affect the ecosystem's dynamics

(Redford, 1992).

In the Neotropics, wild animals are captured both for national and international trade. Much of this trade is illegal but little information is known about the conservation implications of these practices. Statistics indicate that Brazil contributes to at least 10% of the total value of illegal global trade in wildlife (Ferreira and Glock, 2004; Lima, 2007; Ribeiro and Silva, 2007; Alves *et al.*, 2010).

This paper briefly highlights the local illegal trade of wild birds in Rio de Janeiro based on recent confiscations by authorities, and identifies which species are most commonly poached.

### Legislation

Brazil has been a signatory to CITES since 1975, and the Convention is implemented through *Federal Decree N° (3.607) of the year 2000 concerning CITES implementation*. The National Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) is the Administrative and Scientific Authority responsible for controlling the trade in wildlife. In short, the hunting of wildlife is banned in the country under *Federal Law N° (5.197) of the year 1967 concerning protection of wild animals*. Penalties for violation of this law, including the capture, trade, keeping in captivity and the purchase of wild animals without permission are set out in *Federal Law N° (9.605) of the year 1998 concerning environmental crimes, including crimes against fauna*. Species classified as endangered receive full protection under the *Normative Instruction N° (3) of the Ministry of Environment of the year 2003 concerning species of endangered Brazilian fauna*, according to the country's commitments to the Convention on Biological Diversity. While trade in wild-caught birds is illegal, permits may be issued by IBAMA under the *Normative Instruction N° (169) of the year 2008 concerning the categories of use and management of wild animals in captivity* for the capture of some species for captive-breeding purposes and for the sale of second-generation offspring of these species. Such birds should be banded and their sale must take place in pet shops.

Besides IBAMA, other authorities in federal, State and municipal jurisdiction monitor and control the illegal trade of wildlife species, especially in open air markets. As a consequence, thousands of specimens are confiscated each year and taken to the Rehabilitation Center of Wild Animals (CETAS) in Rio de Janeiro, which is administered by IBAMA.

## Background

The majority of wild birds and other wildlife in Brazil that enters illegal trade originates from the north, north-east and central regions of the country. While a proportion is exported by air and sea to the USA, Europe and Asia (Lima, 2007; Ribeiro and Silva, 2007), specimens are sold in the larger cities in the south and south-east regions, especially in the open air markets in the States of São Paulo and Rio de Janeiro, the latter considered one of the most important consumer markets for this illicit activity (Carvalho, 1985; Lopes, 1991; Lima, 2007).

The social chain that sustains wildlife trafficking often starts in remote areas where the rural poor hunt and poach wildlife to supplement their low incomes. Specimens are passed to an intermediary for relatively low prices and transported to urban areas where they are sold to small traders. These middlemen, in turn, connect with long distance traders, the most successful of whom are involved in specialized chains that include animal breeders and businessmen. Other consumers include citizens who want to keep a wild animal as a pet, collectors, the pharmaceutical industry and the fashion trade (Hernandez and Carvalho, 2006; Lima, 2007; Alves *et al.*, 2010).

With the often poor sanitary conditions and close contact involved in dealing with wild animals, there is a risk of transmission of disease to humans as well as to native wildlife populations and livestock that could affect rural livelihoods and the health of ecosystems (Karesh *et al.*, 2005).

## Methods

The authors examined data compiled by CETAS of seizures of wild birds carried out by staff of local authorities in Rio de Janeiro State, south-east Brazil, between January and December 2011. The number of specimens seen, the species most often captured and their conservation status were documented. The scientific nomenclature of the species described in the study follows the taxonomic checklist of BirdLife International.

## Results

During the survey period, a total of 1251 wild birds were confiscated in 16 local street markets in Rio de Janeiro State, representing 51 taxa, distributed in 11 families and 29 genera (Table 1). In the course of the year, a total of 57 inspections were

conducted in several locations, with a minimum of one and a maximum of 229 birds per confiscation (mean of 22).

Table 1: List of species seized in illegal trade in street markets in Rio de Janeiro State, Brazil, during 2011.

FAMILY	TAXA/SPECIES		CITES	Quantity
			Appendix	apprehended
<b>Psittacines:</b>				
Psittacidae	Blue-winged Macaw	<i>Primolius maracana</i>	II	1
	Blue-fronted Parrot	<i>Amazona aestiva</i>	II	1
	Orange-winged Parrot	<i>Amazona amazonica</i>	II	5
	Parrot	<i>Amazona</i> sp.	II	1
	Peach-fronted Parakeet	<i>Aratinga aurea</i>	II	1
	White-eyed Parakeet	<i>Aratinga leucophthalma</i>	II	2
	Maroon-bellied Parakeet	<i>Pyrrhura frontalis</i>	II	1
<b>Toucans and aracarís:</b>				
Ramphastidae	Spot-billed Toucanet	<i>Selenidera maculirostris</i>	non-CITES	2
<b>Passerines:</b>				
Turdidae	Rufous-bellied Thrush	<i>Turdus rufiventris</i>	non-CITES	9
	White-necked Thrush	<i>Turdus albicollis</i>	non-CITES	2
	Creamy-bellied Thrush	<i>Turdus amaurochalinus</i>	non-CITES	6
	Pale-breasted Thrush	<i>Turdus leucomelas</i>	non-CITES	3
	Thrush	<i>Turdus</i> sp.	non-CITES	4
Mimidae	Chalk-browed Mockingbird	<i>Mimus saturninus</i>	non-CITES	2
Thraupidae	Buff-throated Saltator	<i>Saltator maximus</i>	non-CITES	5
	Green-winged Saltator	<i>Saltator similis</i>	non-CITES	32
	Ruby-crowned Tanager	<i>Tachyphonus coronatus</i>	non-CITES	4
	Brazilian Tanager	<i>Ramphocelus bresilius</i>	non-CITES	20
	Green-headed Tanager	<i>Tangara seledon</i>	non-CITES	1
	Azure-shouldered Tanager	<i>Tangara cyanoptera</i>	non-CITES	4
	Golden-chevroned Tanager	<i>Tangara ornate</i>	non-CITES	8
	Palm Tanager	<i>Tangara palmarum</i>	non-CITES	10

	Sayaca Tanager	<i>Tangara sayaca</i>	non-CITES	38
	Tanager	<i>Tangara</i> sp.	non-CITES	2
	Red-cowled Cardinal	<i>Paroaria dominicana</i>	non-CITES	4
	Swallow Tanager	<i>Tersina viridis</i>	non-CITES	2
	Blue Dacnis	<i>Dacnis cayana</i>	non-CITES	7
	Red-legged Honeycreeper	<i>Cyanerpes cyaneus</i>	non-CITES	1
Emberizidae	Rufous-collared Sparrow	<i>Zonotrichia capensis</i>	non-CITES	12
	Blue-black Grassquit	<i>Volatinia jacarina</i>	non-CITES	94
	Pileated Finch	<i>Coryphospingus pileatus</i>	non-CITES	9
	Uniform Finch	<i>Haplospiza unicolor</i>	non-CITES	2
	Saffron Finch	<i>Sicalis flaveola</i>	non-CITES	153
	Chestnut-bellied			
Seed-Finch	<i>Sporophila angolensis</i>	non-CITES		70
	Double-collared Seedeater	<i>Sporophila caerulescens</i>	non-CITES	221
	Rusty-collared Seedeater	<i>Sporophila collaris</i>	non-CITES	5
	Temminck's Seedeater	<i>Sporophila falcirostris</i>	non-CITES	25
	Buffy-fronted Seedeater	<i>Sporophila frontalis</i>	non-CITES	133
	White-bellied Seedeater	<i>Sporophila leucoptera</i>	non-CITES	2
	Lined Seedeater	<i>Sporophila lineola</i>	non-CITES	3
	Black-and-white Seedeater	<i>Sporophila luctuosa</i>	non-CITES	1
	Yellow-bellied Seedeater	<i>Sporophila nigricollis</i>	non-CITES	6
	Seedeater	<i>Sporophila</i> sp.	non-CITES	236
Cardinalidae	Ultramarine Grosbeak	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	non-CITES	6
Tyrannidae	Great Kiskadee	<i>Pitangus sulphuratus</i>	non-CITES	1
Icteridae	Chopi Blackbird	<i>Gnorimopsar chopi</i>	non-CITES	7
	Chestnut-capped Blackbird	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	non-CITES	20
	Shiny Cowbird	<i>Molothrus bonariensis</i>	non-CITES	5
Fringillidae	Hooded Siskin	<i>Sporagra magellanica</i>	non-CITES	4
	Purple-throated Euphonia	<i>Euphonia chlorotica</i>	non-CITES	9
Estrildidae	Common Waxbill	<i>Estrilda astrild</i>	non-CITES	49

*Sporophila* was the genus most represented, with a total of 685 birds and accounting for 56% of the trade; specimens included 221 Double-collared Seedeaters *S. caerulescens*, 133 Buffy-fronted Seedeaters *S. frontalis*, 70 Lesser Seed-Finches *Sporophila (Oryzoborus) angolensis*, and 25 Temminck's Seedeaters *S. falcirostris*. Another taxa frequently represented in the apprehensions included the Saffron Finch *Sicalis flaveola*, with 153 birds (12% of the total); the Blue-black Grassquit *Volatinia jacarina*, with 94 birds (8% of the total); the Common Waxbill *Estrilda astrild*, with 49 birds (4% of the total); the Sayaca Tanager *Thraupis sayaca*, with 38 birds (3% of the total); and the Green-winged Saltator *Saltator similis*, with 32 birds (3% of the total) (Fig. 1.; Table 1). The Common Waxbill is an introduced species with established feral populations in Brazil which are covered by law.

A large number of the birds that were seized—1237— were representatives of the Passeriformes group; 972 (77.7%) belonged to the Emberizidae, and 138 birds to the Thraupidae family, which represented 11% of the total. Only 12 birds, of seven taxa— all psittacines—were of species included in CITES Appendix II (Table 1); two other species—Temminck's Seedeater and Buffy-fronted Seedeater—are considered vulnerable (Machado *et al.*, 2008; IUCN, 2008) and are included in the *Normative Instruction N° (3) of the Ministry of the Environment of the year 2003, concerning species of endangered Brazilian fauna*.



Figure 1: Seizures at Caxias street market: a Green-winged Saltator (*Saltator similis*) in a transport cage (left); caged songbirds species (centre); breeding parrots (right).

## Discussion and Conclusions

Rio de Janeiro is considered one of the major centres for illegal wildlife trade in Brazil (Carvalho, 1985; Lima, 2007). All confiscations recorded during 2011 took place in 16 markets in the metropolitan area of Rio de Janeiro and surrounding areas; 17 out of a total of 57 inspections were concentrated in Caxias street market which is the largest and most well-known location in the State for the illegal trade in wild birds and other wildlife. All birds in trade at open markets are on sale illegally; they have not been ringed, which would prove they had been born in captivity, nor has permission for their sale been granted by the authorities. Furthermore, such sales must take place in pet shops.

The results are similar to those reported in Ferreira and Glock (2004), Efe *et al.* (2006) and Fernandes-Ferreira *et al.* (2012), with the Passeriformes, especially those of the Emberizidae family, being the majority, followed by Psittaciformes. The latter group, besides being included in CITES Appendix II, comprised specimens that fetch higher prices in illegal trade when compared with songbirds. For this reason, there are fewer apprehensions of these species as trade is usually carried out covertly.

Seedeaters *Sporophila* spp. were the most commonly seized specimens and included mainly females and juveniles. This genus was previously listed as the most predominant among the species captured for trade in illegal street markets or to raise as pets (Fernandes-Ferreira *et al.*, 2012). Among the species most often seized, special attention has to be given to the Buffy-fronted Seedeater and Temminck's Seedeater, both of which are listed as vulnerable. Finding out where these birds are captured and kept is essential if extinction in their natural habitat is to be prevented.

Some taxa like Saffron Finch and seedeaters were common in similar surveys carried out by Ferreira and Glock (2004) in Rio Grande do Sul, Pereira and Brito (2005) in Pernambuco, Costa (2005) and Fernandes-Ferreira *et al.* (2012) in Ceará, and Alves *et al.* (2010) in Paraíba. Most of the species recorded at Caxias street market during the study under discussion were described during a survey at the market in 1985 (Carvalho, 1985), although a greater range of species was available at this location at that time. The fact that fewer species are available now could be attributed to hunting and illegal trade of species that has led to local or regional extinctions (Olmos *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2010) or to the development and enforcement of environmental laws in the country, leading to the greater risk of detection.

Although most of the confiscated species have a widespread distribution in Brazil,

some, such as Red-cowled Cardinal, Lined Seedeater *Sporophila lineola* and Black-and-white Seedeater *Sporophila luctuosa*, are exotic to the Rio de Janeiro ecosystem. The presence in the city of Red-cowled Cardinal, which is endemic to some areas of north-east Brazil, could provide some insight into where specimens are being captured and their subsequent route into Rio de Janeiro.

The risk of the spread of infectious diseases as a result of the increased contact amongst different species involved in the wildlife trade industry (Karesh *et al.*, 2005) and the irresponsible or accidental release of alien species, which can have serious ecological consequences, including the introduction of diseases (Efe *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2010; Fernandes-Ferreira *et al.*, 2012), must be guarded against. Established populations of Red-cowled Cardinals have been described in south-eastern Brazil, but are probably specimens that have escaped from captivity (Sick, 1997).

Although there are some estimates of how much Brazil has contributed to the trafficking of wildlife in economic values—around one to two billion dollars annually (Lima, 2007)—it is difficult to quantify the price of transactions involving animals. Those destined for foreign markets fetch higher prices. For example, a Toco Toucan *Ramphastos toco*, Chopi Blackbird *Gnorimospsar chopi* and Green-headed Tanager *Tangara seledon* in the international market are priced, respectively, at USD2000, USD2500 and USD1000 (RENCTAS, 2001). Factors including the quality of singing, the sex (males are more valued), how long the bird has been domesticated, and if a species is rare or difficult to capture, can raise the price of the specimen (Fernandes-Ferreira *et al.*, 2012). In the street markets, however, specimens are sold at cheap prices. Considering the value of the fines established by *Federal Decree N° (6.514) of the year 2008*—USD250 for each animal and USD2500 for each endangered specimen apprehended would need to be paid. However, society has to question whether it is possible to quantify the value of a wild animal; the resulting loss of biodiversity when it is removed from its habitat is difficult to measure (Heemann and Heemann, 2003).

Long-term actions involving tactical intelligence and research associated with monitoring market places are becoming increasingly urgent in order to break the chain of wild animal trafficking, the organization of which should not be underestimated. As a result, more valuable species in illegal trade could be apprehended, such as parrots and toucans, which are seldom openly on sale in the street markets.

## References

- Alves, R.R.N., Nogueira, E.E.G, Araújo, H.F.P. and Brooks, S.E. (2010). Bird-keeping in the Caatinga, NE Brazil. *Human Ecology* 38:147–156.
- Carvalho, C.E.S. (1985). Lista preliminar da fauna comercializada na Feira de Caxias— RJ. *Boletim da FBCN* 20:90–102. CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos) (2011).
- Lista das aves do Brasil. 2011. 10a Edição. Available at: [www.cbro.org.br](http://www.cbro.org.br). Viewed on 20 April 2011.
- Costa, R.G.A. (2005). Comércio ilegal de aves silvestres em Fortaleza, Ceará. *Atualidades Ornitológicas* 125:3.
- Efe, M.A., Martins-Ferreira, C., Olmos, F., Mohr, L.V. and Silveira, L.F. (2006). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para a destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14(10):67–72.
- Ferreira, C.M. and Glock, L. (2004). Diagnóstico preliminary sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 12(1):21–30.
- Fernandes-Ferreira, H., Mendonça, S.V., Albano, C. Ferreira, F.S. and Alves, R.R.N. (2012). Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. *Biodiversity and Conservation* 21:221–244.
- Heemann, A. and Heemann N. (2003). Natureza e percepção de valores. *Natureza e meio ambiente* 7:113–116.
- Hernandez, E.F.T and Carvalho, M.S. (2006). O tráfico de animais silvestres no Estado do Paraná. *Acta. Sci. Human Soc. Sci.* 28(2):257–266.
- IUCN (2008). In: *The IUCN Red List of Threatened Species*. [www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/). Viewed on 10 January 2012.
- Karesh, W.B., Cook, R.A., Bennett, E.L., and Newcomb, J. (2005). Wildlife trade and global disease emergence. *Emerging Infectious Diseases* 11(7):1000–1002.
- Lima, R. (2007). *O tráfico de animais silvestres*. In: RENCTAS (Ed.) *Vida silvestre: o estreito limiar entre preservação e destruição— Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Mata Atlântica: Corredores Central e Serra do Mar*. Brasília: Dupligráfica. 79 pp.
- Lopes, P.R.D. (1991). Comércio de animais silvestres. *Bioikos* 5(1):49–56.
- Machado, A.B.M., Drummond, G.M. and Paglia, A.P. (2008). *Livro vermelho da fauna*

- brasileira ameaçada de extinção*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 1420 p. 2 v. Marini, M.A. and Garcia, F.I. (2005). Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade* 1(1):95–102.
- Mittermeier, R.A., Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B. and Brandon, K. (2005). Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade* 1(1):14–21.
- Olmos, F., Girão e Silva, W.A. and Albano, C.G. (2005). Aves de oito áreas de Caatinga no sul do Ceará e oeste de Pernambuco, Nordeste do Brasil: composição, riqueza e similaridade. *Papeis Avulsos de Zoologia* 45(14):179–199.
- Pereira, G.A. and Brito, M.T. (2005). Diversidade de aves silvestres brasileiras comercializadas nas feiras livres da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco *Atualidades Ornitológicas* 126:14.
- Redford, K.H. (1992). The empty forest. *BioScience* 42(6):412–422.
- RENTAS (2001). 1o Relatório nacional sobre o tráfico da fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional Contra o Tráfico de Animais Silvestres. 108 pp.
- Ribeiro, L.B. and Silva, M.G. (2007). O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura* 59(4):4–5.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: NovaFronteira. 912 pp.
- Sigrist, T. (2006). *Aves do Brasil: uma visão artística*. 2a ed. São Paulo: Avis Brasilis. 672 pp.

**Carlos Alexandre Rey Matias**, Assistant Professor, Department of Epidemiology and Public Health, Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, DESP/IV/UFRRJ, BR-465, Km 7, 23890-000, Seropédica-RJ, Brazil.

Postgraduate programme on Public Health and the Environment, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, ENSP/FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. E-mail: camatias75@gmail.com; camatias@ufrjr.br

**Vinicius Modesto de Oliveira**, Environment Analyst, Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

E-mail: vinicius.oliveira@ibama.gov.br

**Dália dos Prazeres Rodrigues**, Researcher, National Reference Laboratory for Cholera and other Bacterial Infections, Instituto Oswaldo Cruz, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

E-mail: dalia@ioc.fiocruz.br

**Salvatore Siciliano**, Researcher, Postgraduate programme on Public Health and the Environment, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, ENSP/FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. E-mail: sal@ensp.fiocruz.br

#### 4. Capítulo - Prevalência de Enterobacteriaceae em aves silvestres e seu potencial zoonótico

Prevalence of zoonotic bacteria among wild birds from the illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health

*Artigo em revisão*

Carlos Alexandre Rey Matias<sup>1,2,4</sup>, Ingrid Annes Pereira<sup>3</sup>, Eliane Moura Falavina dos Reis<sup>3</sup>, Dália dos Prazeres Rodrigues<sup>3</sup>, and Salvatore Siciliano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório Nacional de Referência de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup> Corresponding author (email: camatias@ufrj.br)

#### Resumo

Prevalência de bactérias zoonóticas entre aves silvestres apreendidas no comércio ilegal no Rio de Janeiro e suas implicações para a saúde pública - O comércio ilegal de animais selvagens pode aumentar o risco de transmissão de doenças infecciosas, causando não somente surtos de doenças no homem, mas ameaçando os animais de produção, populações selvagens de animais e a saúde dos ecossistemas. Estudos epidemiológicos sobre zoonoses bacterianas envolvendo aves silvestres são raros no Brasil. Entre março de 2011 e março de 2012, foi investigada a prevalência de Enterobacteriaceae em suabes de cloaca de 109 aves passeriformes e psitacídeos que foram apreendidas no comércio ilegal no Rio de Janeiro e trazidas para um centro de reabilitação. Bactérias Gram-negativas foram isoladas em 86 aves (78,9%). Uma média

de 1,68 ( $\pm 1,30$ ) espécies diferentes de bactéria foram isoladas por indivíduo, com um máximo de cinco bactérias em 3 espécies diferentes de ave. As bactérias mais frequentemente isoladas foram *Escherichia coli*, seguida de *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e outras enterobactérias. *Salmonella* sorovar Typhimurium foi isolada em uma Cigarra-verdadeira (*Sporophila falcirostris*) e duas *Salmonella* sorovar Panama foram isoladas de dois Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*). A resistência aos antimicrobianos foi demonstrada em 60 das 70 cepas selecionadas, cujos padrões de resistência variaram entre um a nove das drogas testadas. Resistência ao ceftiofur foi a mais prevalente, seguida da ampicilina e ceftriaxona. O potencial para a disseminação de cepas resistentes pelas situações propiciadas pela captura e manejo de animais silvestres pode se tornar um problema para a conservação de espécies e para a saúde pública.

#### Abstract

The illegal wildlife trade can increase the risk of infection diseases transmission, causing not only human disease outbreaks, but also threaten livestock, native wild populations and the ecosystem health. Bird species may act as vectors in the transmission of enteric pathogens. Epidemiological studies of zoonotic bacteria involving wild birds are rare in Brazil. From March 2011 to March 2012 we investigate the prevalence of Enterobacteriaceae in cloacal swab samples of 109 birds from passerine and psittacidae families that were pouched in the illegal trade in Rio de Janeiro and send to a rehabilitation center. Gram-negative bacteria were isolated from 86 wild birds (78,9%). A mean ( $\pm$ SD) of 1,68 ( $\pm 1,30$ ) different bacteria species were isolated per bird, with a maximum of five from three distinct bird species. The most frequent isolated bacteria were *Escherichia coli*, followed by *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. *Salmonella* ser. Typhimurium was isolated from a Temminck's Seedeater (*Sporophila falcirostris*) and two *Salmonella* ser. Panama were isolated from two specimens of Chestnut-capped Blackbird (*Chrysomus ruficapillus*). Antibiotic resistance was present in 60 of the 70 selected bacterial isolates. The resistance patterns vary from one to 9 of the antibiotics tested. Resistance to ceftiofur was the most prevalent, followed by ampicilin and ceftriaxone. Potential for dissemination of resistant strains through situations offered by captive management may become a problem for the conservation of natural populations and to public health.

*Key words:* antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, public health, *Salmonella*, wild birds.

## Introduction

The illegal wildlife trade is considered the most lucrative illegal activity in the world, after to weapons and illicit drug trade (Ferreira and Glock, 2006; Lima, 2007; Ribeiro and Silva, 2007; Alves et al. 2012). The Brazilian law considers crime the capture of wild animals and their maintenance in captivity without legal permission. Because Brazil is one of the richest countries in the world in terms of biodiversity (Mittermeier et al., 2005), specially birds are captured both for national and international trade and then brought to rehabilitation centers after being confiscated by official authorities (Alves et al. 2012; Matias et al., 2012).

After habitat loss, poaching and hunting of wildlife are considered the most important causes of population declines, and could significantly affect the ecosystem's dynamics (Redford, 1992). Besides these consequences, risk of disease transmission has to be considered, given that captivity allows greater contact between species, favoring the transmission of infectious agents (Chomel et al., 2007; Alves et al., 2010; Fernandes-Ferreira et al., 2012), and provides disease transmission mechanisms that can cause not only human disease outbreaks, but also threaten livestock, native wildlife populations and the ecosystem health (Karesh et al., 2005).

Wild birds and migratory species may act as vectors in the transmission of different microorganisms, and may have a role in the spreading of emerging and re-emerging pathogens (Hubálek, 2004; Tsiodras et al., 2008; Benskin et al., 2009). They are susceptible to various bacterial pathogens common to human and domestic animals, in addition to other potential pathogenic microorganisms, such as protozoa and viruses (Kruse et al 2004; Benskin et al. 2009).

Studies involving the microbiota of wild birds are rare or limited to a small number of animals, and those involving the prevalence of Enterobacteriaceae are limited to certain groups such as seagulls. Those involving passerines are from outbreaks with high mortality, providing no information on the prevalence in apparently healthy animals. Thus, the role of these birds as vectors of bacterial pathogens, may be underestimated (Benskin et al 2009).

The zoonotic Gram-negative bacteria previously isolated both from apparently healthy as well as sick avian hosts include *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. With the exception of the last two etiologic agents, that do not cause disease in normal conditions, these bacteria can cause gastroenteritis, respiratory symptoms, septicemia and even mortality in humans (Kruse et al 2004; Steele et al 2005; Benskin et al 2009).

The use of antibiotics in animals in order to control bacterial infections and their use as growth promoters in poultry production can result in the selection of resistant strains of pathogenic bacteria as much as those that take part of normal microbiota. This is considered the main factor triggering the emergence, selection and spread of resistant microorganisms, both in veterinary and human medicine. Although wildlife do not have contact with antibiotics, can be infected by wild birds that can serve as vectors since the isolation of antibiotic-resistant bacteria has been described in these animals. Besides becoming a problem for wildlife conservation, spread of multi-drug resistant strains may have implications for public health. The manipulation of these animals and the disposal of their sanitary waste represent a hazard to the professionals involved in surveillance/policing activities, as veterinarians, biologists and caregivers (Kruse et al. 2004; Steele et al 2005; Benskin et al. 2009).

To better assess the risk of exposure to zoonotic bacteria carried by wild birds, for these professionals, we conduct a longitudinal survey in a rehabilitation center to describe and compare the prevalence of Enterobacteriaceae among groups of birds. The potential pathogenicity to humans was analyzed by the presence of toxin genes in selected isolates of *Escherichia coli*. Finally, we tested the antibiotic resistant in selected strains that were representative of bacterial species isolated.

## Methods

Wild birds specimens were sampled on arrival, at Rehabilitation Center of Wild Animals (CETAS) in Rio de Janeiro State, Brazil, after being confiscated in illegal trade markets by the police from March 2011 to March 2012. The scientific nomenclature of the bird species follows the Brazilian Ornithological Records Committee (CBRO). Cloacal samples were obtained from birds chosen randomly in a total of nine apprehensions. One hundred-and-nine birds, representing 30 species were

chosen according to the diversity of species in each one, being the highest frequency from the families Emberezidae and Thraupidae (Table 1). Samples were taken by clinic procedures, using swabs introduced into Cary Blair Medium under refrigeration conditions to Enterobacteria Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), in Rio de Janeiro, Brazil for microbiological assays.

The collected material was transferred to Nutrient Broth (Difco) (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Then, samples were enriched onto Rappaport-Vassiliadis (42<sup>0</sup>C overnight), Silliker Medium and Muller-Kauffmann Medium (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Thereafter, grows were plated for isolation onto Hektoen enteric agar (OXOID) (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Representatives of all distinct colonies were confirmed in Triple Sugar Iron (Difco) and inoculated into SIM medium for biochemical characterization through susceptibility to L-lysine decarboxylase, to citrate as a carbon source, mobility, hydrogen sulfide prucuction, glucose and lactose fermentation and indole production. The presumptive diagnosis of the distinct Gram-negative isolates was performed by biochemical tests recommended by Costa and Hofer (1972), Murray et al. (1995) and Murray et al. (2007).

The identification of subspecies of *Salmonella* spp. was determined using substrates according to Grimont and Weill (2007). The antigenic characterization, including an induction/absorption phase to recognize the somatic and flagellar fraction was performed by slide agglutination with somatic and flagellar poly and monovalent antigen based on the Kaufmann-White scheme.

To compare the prevalences of bacteria isolated between groups of birds, Fisher Exact test was performed using SPSS software. Two-way general linear model analysis of variance (ANOVA) was used to examine differences in species richness of bacteria isolated from bird families, and from the most common bird species. *p* values of 0.05 or less were considered significant. Species richness values were square-root transformed for normality.

Susceptibility testing was performed in 70 isolates of *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Salmonella* spp., from 54 birds by Minimum Inhibitory Concentration Assay (MIC) in Agar and Broth to determine the lowest concentrations of different antimicrobial drugs. Each one was evaluated in a serial dilution according to the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) with ampicillin, ceftriaxone, ceftiofur, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim 19:1, chloramphenicol, gentamicin,

nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, and nitrofurantoin. For quality control of the antimicrobial susceptibility test, the following reference strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Escherichia coli* ATCC25922.

Table 1: Wild birds sampled in CETAS, Rio de Janeiro (Brazil) from March 2011 to March 2012.

Family	Species	Total
Emberezidae	Saffron Finch ( <i>Sicalis flaveola</i> )	15
	Blue-black Grassquit ( <i>Volatinia jacarina</i> )	11
	Double-collared Seedeater ( <i>Sporophila caerulescens</i> )	11
	Seedeater ( <i>Sporophila</i> spp.)	8
	Buffy-fronted Seedeater ( <i>Sporophila frontalis</i> )	3
	Rufous-collared Sparrow ( <i>Zonotrichia capensis</i> )	5
	Temminck's Seedeater ( <i>Sporophila falcistrostris</i> )	3
	Chestnut-bellied Seed-Finch ( <i>Sporophila angolensis</i> )	2
	Lined Seedeater ( <i>Sporophila lineola</i> )	1
	Pileated Finch ( <i>Coryphospingus pileatus</i> )	1
Thraupidae	Sayaca Tanager ( <i>Tangara sayaca</i> )	5
	Golden-chevroned Tanager ( <i>Tangara ornata</i> )	4
	Brazilian Tanager ( <i>Ramphocelus bresilius</i> )	3
	Red-cowled Cardinal ( <i>Paroaria dominicana</i> )	3
	Ruby-crowned Tanager ( <i>Tachyphonus coronatus</i> )	1

Cardinalidae	Green-winged Saltator ( <i>Saltator similis</i> )	6
	Buff-throated Saltator ( <i>Saltator maximus</i> )	1
	Ultramarine Grosbeak ( <i>Cyanoloxia brissonii</i> )	1
Icteridae	Chestnut-capped Blackbird ( <i>Chrysomus ruficapillus</i> )	8
	Shiny Cowbird ( <i>Molothrus bonariensis</i> )	1
	Chopi Blackbird ( <i>Gnorimopsar chopi</i> )	3
Turdidae	Rufous-bellied Thrush ( <i>Turdus rufiventris</i> )	4
	White-necked Thrush ( <i>Turdus albicollis</i> )	1
	Creamy-bellied Thrush ( <i>Turdus amaurochalinus</i> )	1
Psittacidae	Maroon-bellied Parakeet ( <i>Pyrrhura frontalis</i> )	1
	White-eyed Parakeet ( <i>Aratinga leucophthalma</i> )	1
	Blue-fronted Parrot ( <i>Amazona aestiva</i> )	1
Fringillidae	Purple-throated Euphonia ( <i>Euphonia chlorotica</i> )	2
Estrildidae	Common Waxbill ( <i>Estrilda astril</i> )	1
Tyrannidae	Great Kiskadee ( <i>Pitangus sulphuratus</i> )	1
Total		109

---

## Results

Gram-negative bacteria were isolated from 86 of 109 wild birds sampled (78,9%). A mean ( $\pm$ SD) of 1,68 ( $\pm$ 1,30) different bacteria species were isolated per bird, with a maximum of five from three distinct bird species, a Rufous-collared Sparrow

(*Zonotrichia capensis*), a Sayaca Tanager (*Tangara sayaca*) and a Green-winged Saltator (*Saltator similis*). The most frequent isolated bacteria were *E. coli*, that was prevalent in 55 animals. The next most frequent bacteria isolated were, in decreasing order, *Enterobacter* spp. and *Klebsiella pneumoniae* (Table 2). *Salmonella* ser. Typhimurium was isolated from a Temminck's Seedeater (*Sporophila falcirostris*) and two *Salmonella* ser. Panama were isolated from two specimens of Chestnut-capped Blackbird (*Chrysomus ruficapillus*) that were kept together in the same cage.

There were no significant differences in the prevalences of any microorganism between the most common bird species, Saffron Finch (n=15), Blue-black Grassquit (n=11) and Double-collared Seedeater (n=11), by a Fisher Exact test ( $p < 0,05$ ). Based on a Fisher Exact test ( $p < 0,05$ ), Enterobacteriaceae were significant higher in birds of the family Thraupidae (n=16), Cardinalidae (n=8), Turdidae (n=6) and Psittacidae (n=3) than in birds of the family Icteridae (n=12) and Emberezidae (n=60) ( $p = 0,003$ ). *Escherichia coli* were significant higher in birds of the family Psittacidae (n=3) than in birds of the family Thraupidae (n=16), Turdidae (n=6), Cardinalidae (n=8), Icteridae (n=12) and Emberezidae (n=60) ( $p < 0,05$ ). *Klebsiella pneumoniae* were significant higher in birds of the family Turdidae (n=6), than in birds of the family Thraupidae (n=16), Icteridae (n=12), Cardinalidae (n=8), and Emberezidae (n=60) ( $p = 0,01$ ).

Mean ( $\pm$ SD) species richness of Enterobacteriaceae among each family group was 1,1 ( $\pm 1,06$ ) between Emberezidae, 2,62 ( $\pm 1,08$ ) between Thraupidae birds, 2,16 ( $\pm 1,46$ ) between Icteridae, 2,62 ( $\pm 1,40$ ) between Cardinalidae birds, 2,33 ( $\pm 1,03$ ) between Turdidae birds and 1,33 ( $\pm 0,57$ ) between Psittacidae birds. These differences were significant ( $F = 6,71$ ,  $p < 0,05$ ) based on a general linear-model ANOVA (Tukey's post hoc test: Thraupidae > Emberezidae,  $p < 0,05$ ; Cardinalidae > Emberezidae,  $p = 0,01$ ). The mean species richness of bacteria between the most common wild bird species was 1,26 ( $\pm 0,96$ ) for Saffron Finch, 0,81 ( $\pm 0,98$ ) for Blue-black Grassquit and 0,81 ( $\pm 0,75$ ) for Double-collared Seedeater. These differences were not significant ( $DF = 1,08$ ,  $p = 0,35$ ) based on a general linear-model ANOVA.

The *eaeA* gene was present in five of 61 *E. coli* isolates tested from a White-necked Thrush (*Turdus albicollis*), a Chestnut-bellied Seed-Finch (*Sporophila angolensis*), a Sayaca Tanager (*Tangara sayaca*), a Chestnut-capped Blackbird (*Chrysomus ruficapillus*) and a Chopi Blackbird (*Gnorimopsar chopi*). The *stx2* gene was simultaneously present in the Chopi Blackbird sample.

Antibiotic resistance was present in 60 of the 70 selected bacterial isolates (Table 3). The resistance patterns vary from one to 9 of the antibiotics tested. Resistance ceftiofur (71,67%) was the most prevalent, followed by ampicilin (46,67%) and ceftriaxone (35%).

Table 2: Prevalences of Enterobacteriaceae from wild birds families in CETAS, Rio de Janeiro, Brazil, March 2011 to March 2012.

Bacteria isolated	Isolates from each bird family							Total n=109
	Emberizidae n=60	Thraupidae n=16	Icteridae n=12	Cardinalidae n=8	Turdidae n=6	Psittacidae n=3	Misc. n=4	
<i>Escherichia coli</i>	17 (28.3)	14 (87.5)	7 (58.3)	5 (62.5)	5 (83.3)	3 (100.0)	4 (100.0)	55 (50.5)
<i>Salmonella ser. Typhimurium</i>	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Salmonella ser. Panama</i>	0 (0)	0 (0)	2 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)
<i>Citrobacter freundii</i>	3 (5.0)	1 (6.3)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)	1 (25.0)	6 (5.5)
Other <i>Citrobacter</i>	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13 (21.7)	9 (56.3)	6 (50.0)	4 (50.0)	4 (66.7)	0 (0)	3 (75.0)	39 (35.8)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Enterobacter spp.</i>	21 (35.0)	11 (68.8)	8 (66.7)	5 (62.5)	3 (50.0)	1 (33.3)	1 (25.0)	50 (45.9)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Enterobacter intermedius</i>	0 (0)	0 (0)	1 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (1.7)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)
<i>Hafnia alvei</i>	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (3.7)
<i>Serratia spp.</i>	4 (6.7)	2 (12.5)	0 (0)	2 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (7.3)
<i>Proteus spp.</i>	0 (0)	1 (6.3)	1 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)
<i>Morganella morganii</i>	0 (0)	2 (12.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)
<i>Providencia spp.</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25.0)	1 (0.9)
<i>Enterobacteriaceae</i>	38 (63.3)	16 (100.0)	11 (91.7)	8 (100.0)	6 (100)	3 (100.0)	4 (100.0)	86 (78.9)

Table 3: Enterobacteriaceae isolated from wild birds in CETAS, Rio de Janeiro, Brazil,  
March 2011 to March 2012, tested for antibiotic resistance.

Host species	Bacterial isolate	Antibiotic resistance											Antibiotic resistat
		AMP	CRO	CEF	TCY	SXT	CHL	GEN	NAL	CIP	ENR	NIT	
<i>Saltator similis</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	1
<i>Sporophila angolensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	R	S	S	I	S	4
	<i>Klebsiella</i>	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	9
<i>Aratinga leucophthalma</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	5
<i>Turdus amaurochalinus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
	<i>Klebsiella</i>	R	I	R	I	R	I	S	R	S	I	R	5
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S	R	5
<i>Gnorimopsar chopi</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	I	7
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	2
	<i>Klebsiella</i>	R	S	S	S	S	I	S	S	S	I	R	2
<i>Tangara sayaca</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	3
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
	<i>Klebsiella</i>	R	R	S	I	R	I	I	S	S	I	I	3
<i>Euphonia chlorotica</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	3
	<i>Klebsiella</i>	R	S	I	S	R	I	S	S	S	I	R	3
<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	S	S	R	S	S	S	R	R	5
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	2
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	I	3
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	1

---

	<i>Klebsiella</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	2
<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	7
<i>Euphonia chlorotica</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	S	R	S	I	R	7
<i>Sporophila caerulea</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	1
<i>Sporophila</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0
<i>Pitangus sulphuratus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
<i>Pyrrhura frontalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	0
<i>Ramphocelus bresilius</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	R	S	I	S	S	I	I	2
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I	0
	<i>Salmonella</i> ser. Panama	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	8
<i>Turdus albicollis</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	1
	<i>Klebsiella</i>	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	1
<i>Estrilda astrild</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	I	R	S	S	S	S	R	I	I	I	2
<i>Tangara sayaca</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	I	R	S	S	S	S	R	I	I	I	2
<i>Volatinia jacarina</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	0
<i>Sporophila frontalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	I	1
<i>Sporophila falcirostris</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0
<i>Tangara ornata</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	S	R	I	I	R	S	R	I	5
<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	I	0
<i>Sporophila caerulea</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	I	R	S	S	I	R	S	S	I	S	2
<i>Tangara ornata</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	2
	<i>Klebsiella</i>	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	R	2

---

<i>Saltator similis</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	4
<i>Tangara sayaca</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	S	I	S	S	I	I	2
	<i>Klebsiella</i>	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	2
<i>Volatinia jacarina</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	S	R	I	I	R	S	R	I	5
<i>Paroaria dominicana</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	R	S	R	S	I	R	7
<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	S	S	S	I	R	S	I	I	3
<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	R	R	I	S	S	S	S	S	I	I	2
<i>Tangara ornata</i>	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1
<i>Volatinia jacarina</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	I	4
<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	5
<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	3
<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	2
<i>Paroaria dominicana</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	1
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	I	R	I	I	R	S	R	I	5
<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	S	S	S	I	S	S	I	I	2
<i>Ramphocelus bresilius</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	I	S	I	I	S	S	S	I	2
<i>Tangara sayaca</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	I	R	S	S	I	I	S	S	S	I	1
<i>Sporophila frontalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	I	R	S	S	S	I	S	S	S	I	1
<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	R	S	S	I	S	S	S	I	3
<i>Saltator similis</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	I	R	I	S	I	R	R	S	R	I	5
<i>Paroaria dominicana</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	S	R	I	R	R	R	R	S	S	I	5
<i>Tangara ornata</i>	<i>Escherichia coli</i>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	I	S	I	R	R	5
	<i>Salmonella ser. Panama</i>	S	R	R	S	S	S	R	S	S	I	I	3
<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Klebsiella</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	4

<i>Sporophila falcirostris</i>	<i>Salmonella</i>	ser.	I	R	R	R	S	S	S	R	S	R	I	5
	Typhimurium													
	Total		28	21	43	17	17	6	8	17	4	12	19	

AMP= ampicillin; CRO= ceftriaxone; CEF= ceftiofur; TCY= tetracycline; SXT= sulfamethoxazole/trimethoprim; CHL= chloramphenicol; GEN= gentamicin; NAL= nalidixic acid; CIP= ciprofloxacin; ENR= enrofloxacin; NIT= nitrofurantoin

S= no resistance; I= intermediate; R= resistant

## Discussion

*Escherichia coli* was the bacteria most frequently isolated from wild birds in this study, being significant higher in psittacidae birds than in the passerines. This microorganism is the most abundant facultative bacterial species in the normal microbiota of the large intestines of animals and humans (Gopee et al. 2000) and has been isolated from a range of bird species, including passerines (Benskin et al. 2009). But the prevalence is higher in carnivorous or omnivorous bird species, whereas granivorous, like the most passerines in our study, have lower prevalences (Steele et al. 2005). The higher prevalence in our study could be explained by the poor sanitary conditions that the animals are maintained after being captured in the wild.

Enteropathogenic strains have been isolated from healthy or diseased wild birds and they can be carriers of *E. coli* strains resistant to antibiotics (Hubálek 2004). Of the five *E. coli* isolates that carried the *eaeA* gene, one carried simultaneously the *stx2* gene. The presence of both genes classifies the strain as enteropathogenic (EPEC) or enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli*.

The low frequency of *Salmonella* spp. isolated in the study is in agreement with other studies with apparently healthy wild birds (Tizard, 2004; Abulreesh et al., 2007). Despite of the low detection rate in the animals sampled and the difficult to collect biological material from birds seized in the illegal wildlife trade, this signals that the serovars isolated circulate in bird's natural population. Several studies reveal that *Salmonella* ser. Typhimurium and *Salmonella* ser. Panama circulate in Brazil and in another countries, and can be isolated from human and animal biological source (Bessa et al., 2004; Loureiro et al., 2010; Kich et al., 2011).

*Salmonella* ser. Typhimurium is frequently associated with disease in many different mammalian and avian host species and was considered very frequent in outbreaks that affected men and livestock, especially poultry, until the 1990s (Hofer et al., 1997; Rabsch et al., 2002). Outbreaks of *Salmonella* ser. Typhimurium infections in humans, having the contact with wild passerine birds as a common source have been described in many countries in Europe, U.S. and in New Zealand (Kapperud et al., 1998; Refsum, 2003; Thornley et al., 2003). The serovar Panama is not very frequently isolated in epizooties and human outbreaks in Brazil (Hofer et al., 1997).

Some of the bacteria isolated, like *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. and *Morganella morganii* are known or suspected to cause diseases in men, and often are associated with nosocomial infections (Steele et al. 2005).

Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria has been found in other studies involving wild birds (Tsubokura et al. 1995; Nascimento et al. 2003; Steele et al. 2005; Hasan et al. 2012). Resistance to ampicillin is consistent with the results obtained by Tsubokura et al. (1995), Nascimento et al. (2003) and Steele et al. (2005), as well as resistance to ceftiofur, obtained by Steele et al. (2005). It is important to note the number of multi-drug resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, both important nosocomial pathogens (Steele et al. 2005).

The resistance profiles alert for the importance of a surveillance program to prevent impacts on public health. It must be noted that a great number of isolates and all the three *Salmonella* strains were resistant to ceftiofur and ceftriaxone, 3rd generation cephalosporins, the first used in veterinary medicine and the other used to treat severe human *Salmonella* infections.

The presence of antibiotic resistance in wildlife can evidence the impact of human activities in natural ecosystems (Blanco et al. 2007). Wild birds can acquire and disseminate enteric bacteria, including resistant strains, by fecal-oral route, through species that can act as vectors, like insects, rodents and other birds and by contact with human activities, like contaminated food and human waste. In these cases they can act as reservoir or vectors of resistant bacterial pathogens (Steele et al. 2005; Hilbert et al. 2012).

The detection of multidrug phenotype in wild birds feces represents an important route to transmission of this pathogen and its antimicrobial resistance mechanisms throughout national and international frontiers fostered by the trade of wild animals and close contact with humans. Additional studies carried out in natural environments, including professionals that manage wild animals are key to better investigate the source of resistant strains isolated from wildlife.

#### Literature Cited

Abulreesh, HH, Goulder, R, Scott, GW. 2007. Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. *Ringin & Migration* 23: 193–200.

Alves, RRN, Nogueira, EEG, Araújo, HFP, Brooks, SE. 2010. Bird-keeping in the Caatinga, NE Brazil. *Hum Ecol* 38: 147-156.

Alves, RRN, Lima, JRF; Araujo, HFP. 2012. The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conserv Int* 1-13.

Benskin, CM, Wilson, K, Jones, K, Hartley, IR. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev Camb Philos Soc* 84: 349-73.

Bessa, MC, Costa, M, Cardoso, M. 2004. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do rio Grande do Sul. *Pesquisa Vet Brasil* 24(2): 80-84.

Blanco, G, Lemus, JA, Grande, J, Gangoso, L, Grande, JM, Donázar, JA, Arroyo, B, Frías, O, Hiraldo, F. 2007. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ Microbiol* 9: 1738-49.

CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). 2011. *Lista das aves do Brasil*. 10ª Edição, <http://www.cbro.org.br/listabr.pdf>. Accessed April 2013.

Chomel, BB, Belotto, A, Meslin, F. 2007. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infec Dis* 13(1): 6-11.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013: *Performance standards for antimicrobial susceptibility*. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA.

Costa GA, Hofer E. (1972) Isolamento e identificação de enterobactérias. Monography, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Fernandes-Ferreira, H, Mendonça, SV, Albano, C, Ferreira, FS, Alves, RRN. 2012. Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. *Biodivers Conserv* 21: 221-244.

Ferreira, CM, Glock, L. 2004. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 12(1): 21-30.

Gopee, NV, Adesiyun, AA, Caesar, K. 2000. A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds and reptiles in Trinidad. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(3): 353-360.

Grimont, PAD, Weill, FX. 2007. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, 9<sup>th</sup> Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 166 pp.

Hasan, B, Sandegren, L, Melhus, A, Drobni, M, Hernandez, J, Waldenström, J, Alam, M, Olsen, B. 2012. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 18(12): 2055-2058.

Hilbert, F, Smulders, FJM, Chopra-Dewasthaly, R, Paulsen, P. 2012. *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int* 45: 603–608.

Hofer, E, Filho, SJS, Reis, EMF. 1997. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Vet Brasil* 17(2): 55-62.

Hubálek, Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 40 (4): 639-659.

Kapperud, G, Stenwig, H, Lassen, J. 1998. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway. *Am J Epidemiol* 147(8): 774-782.

Karesh, WB, Cook, RA, Bennett, EL, Newcomb, J. 2005. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infec Dis* 11(7): 1000-1002.

Kich, JD, Coldebella, A, Morés, N, Nogueira, MG, Cardoso, M, Fratamico, PM, Call, JE, Fedorka-Cray, P, Luchansky JB. 2011 Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int J Food Microbiol* 151: 307–313.



RENTAS (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres). 2001. *1º Relatório nacional sobre o tráfico da fauna silvestre*. Rede Nacional Contra o Tráfico de Animais Silvestres, Brasília, 108 pp.

Ribeiro, LB, Silva, MG. 2007. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura* 59(4): 4-5.

Steele CM, Brown RN, Botzler RG. 2005. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the pacific coast of California and Washington, USA. *J Wildl Dis* 41(4): 235-244.

Thornley, CN, Simmons, GC, Callaghan, ML, Nicol, CM, Baker, MG, Gilmore, KS, Garrett, NKG. 2003. First incursion of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT160 into New Zealand. *Emerg Infect Dis* 9(4): 493-495.

Tizard, I. 2004. Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13(2): 50-66.

Tsiodras S, Kelesidis, T, Kelesidis, I, Bauchinger U, Falagas, ME. 2008. Human infections associated with wild birds. *J Infection* 56: 83-98.

Tsubokura, M, Matsumoto, A, Otsuki, K, Animas, SB, Sanekata, T. 1995. Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from migratory waterfowl. *J Wildl Dis* 31(3): 352-357.

5. Capítulo – Perfil molecular de *Salmonella* isoladas em aves apreendidas no tráfico de animais silvestres no Rio de Janeiro

Isolation of *Salmonella* in wild birds from wildlife illegal trade in Rio de Janeiro and its implications for public health

*Artigo em revisão*

Carlos Alexandre Rey Matias, Ingrid Annes Pereira, Gutierre de Andrade da Silva, Maiara da Silva Araújo, Rafaelle da Silva Motta, André Felipe Mercês Santos, Eliane Moura Falavina dos Reis, Rudi Pereira Lopes, Sandra Christakis, Dália dos Prazeres Rodrigues and Salvatore Siciliano

Author affiliations: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (C.A.R. Matias); Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (C.A.R. Matias, S. Siciliano); Laboratório Nacional de Referência de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (I.A. Pereira, G.A. Silva, M.S. Araújo, R.S. Motta, A.F.M. Santos, E.M.F. Reis, D.P. Rodrigues); Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (R.P. Lopes, S. Christakis)

Resumo

Isolamento de *Salmonella* em aves silvestres oriundas do comércio ilegal de animais silvestres no Rio de Janeiro e suas implicações para a saúde pública - Aves podem atuar como vetores na transmissão de patógenos zoonóticos, incluindo enterobactérias. Entre março de 2011 e março de 2012, a prevalência de *Salmonella* spp. foi investigada em 109 aves silvestres que foram apreendidas no comércio ilegal de animais silvestres no Rio de Janeiro. Uma cepa de *Salmonella* sorovar Typhimurium e duas cepas de

*Salmonella* sorovar Panama foram isoladas de passeriformes e todas apresentaram resistência múltipla aos antibióticos. A análise por PFGE demonstrou que a cepa de *Salmonella* sor. Typhimurium tinha 100% de similariedade com duas amostras provenientes de um surto humano, isoladas posteriormente no sul do Brasil. As duas cepas de *Salmonella* sor. Panama apresentaram a mesma origem clonal e nunca estiveram associadas com epizootias e surtos humanos. A potencial disseminação de *Salmonella* resistentes aos antibióticos através das situações propiciadas pelo manejo em cativeiro e o isolamento da mesma cepa em aves silvestres e no homem podem se tornar um problema para as populações selvagens e para a saúde pública.

#### Abstract

Birds may act as vectors in the transmission of zoonotic pathogens, including enteric bacteria. From March 2011 to March 2012 the prevalence of *Salmonella* spp. were investigated in 109 wild birds that were pouched in the illegal wildlife trade in Rio de Janeiro. One strain of *Salmonella* ser. Typhimurium and two strains of *Salmonella* ser. Panama were isolated from passerine species and all of them had resistance to multiple antibiotics. PFGE analyses showed that the Typhimurium strain had 100% of similarity with two strains from a human outbreak, isolated later in south Brazil. The two Panama strains showed the same clonal origin and never were associated with epizooties and human outbreaks. Potential for dissemination of resistant *Salmonella* through situations offered by captive management and the isolation of the same strain from wild birds and human source, may become a problem for the conservation of natural populations and to public health.

*Key words:* *Salmonella*, wild birds, antibiotic resistance, public health.

#### Introduction

Brazil is one of the richest countries in the world in terms of its biodiversity, harbouring an estimated 10 to 12% of all known species (1), including more than 1800 bird species, some endemic species (2, 3) and a number that are considered threatened (4).

The illegal wildlife trade is a lucrative activity that is considered the third largest illegal trade in the world, behind arms trafficking and illicit drug trade (5, 6). The Brazilian law considers crime the capture of wild animals and their maintenance in captivity without legal permission.

After habitat loss, poaching and hunting of wildlife are considered the most important causes of population declines, and could significantly affect the ecosystem's dynamics (7). Besides these consequences, risk of disease transmission has to be considered, given that captivity allows greater contact between species, favoring the transmission of infectious agents (8, 2, 3), and provides disease transmission mechanisms that can cause not only human disease outbreaks, but also threaten livestock, native wildlife populations and the ecosystem health (9).

Wild birds and migratory species may act as vectors in the transmission of different exotic microorganisms, and may have a role in the spreading of emerging and re-emerging pathogens (10, 11, 12). They can carry a wide range of zoonotic pathogens, including enteric pathogenic bacteria, either being themselves diseased or being seemingly healthy carriers or the host of infected vectors (13).

Bacteria of the genus *Salmonella* colonize the digestive tract of reptiles, birds and mammals, including men, and are involved in gastroenteritis and another kind of infections (14). Salmonellosis cause gastroenteritis in humans in both developed or developing countries, leading to economic losses and animal and human illness, being the second most often reported zoonotic disease, and the most important bacterial foodborne disease in humans in industrialized countries (15, 16). In wild birds, this bacterial disease may be a source of infection for humans and domestic animals, especially *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium has a wide host range and can be associated with disease in humans, livestock, waterfowl, rodents and birds (17, 18), being commonly found in the intestinal tract of wild birds (11).

Additionally it is necessary to clarify its role in the dissemination of antimicrobial resistance, an emergency problem worldwide, considering that the use of these drugs in human and veterinary medicine and the current perspective of globalization, represent factors for its spread (19) and these birds are important in the context of transmission of antibiotic resistant strains to human (13).

Epidemiological studies of salmonellosis involving wild birds are rare in Brazil. The aim of the present study was to investigate the prevalence of *Salmonella* species in

cloacal swab samples of wild birds that were pouched in the illegal trade in Rio de Janeiro, and its antimicrobial resistance profile as a way to better inform policies aiming to curb the spread and transmission of resistant strains to the environment and humans, using a subtyping method to detect genetic markers for the main antimicrobials applied to *Salmonella* infections used in veterinary.

## Methods

Wild birds were confiscated in illegal trade markets by the police in Rio de Janeiro, Brazil, from March 2011 to March 2012. Further information on the illegal trade of birds in Rio de Janeiro is available in Matias et al. (20). Then, specimens were sent to the rehabilitation facility CETAS (Rehabilitation Center of Wild Animals) where they were sampled onsite. Cloacal samples were obtained from birds chosen randomly in a total of nine apprehensions. One hundred-and-nine birds, representing 30 species were chosen according to the diversity of species in each one, being the highest frequency from the families Emberezidae and Thraupidae. In all of them, all species were represented in a maximum of sixteen and a minimum of nine birds. Samples were taken by clinic procedures, using swabs introduced into Cary Blair Medium under refrigeration conditions to Enterobacteria Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), in Rio de Janeiro, Brazil, for microbiological assays.

The collected material was transferred to Nutrient Broth (Difco) (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Then, samples were enriched onto Rappaport-Vassiliadis (42<sup>0</sup>C overnight), Silliker Medium and Muller-Kauffmann Medium (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Thereafter, grows were plated for isolation onto Hektoen enteric agar (OXOID) (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Suspected colonies were confirmed in Triple Sugar Iron (Difco) and then biochemically characterized through susceptibility to L-lysine decarboxylase, to citrate as a carbon source, mobility, production of hydrogen sulfide and indole by SIM medium. The identification of subspecies was determined using substrats according to Grimont and Weill (21). The antigenic characterization, including an induction/absorption phase to recognize the somatic and flagellar fraction was performed by slide agglutination with somatic and flagellar poly and monovalent antigen based on the Kaufmann-White scheme.

Susceptibility testing was performed by Minimum Inhibitory Concentration Assay (MIC) in Agar and Broth to determine the lowest concentrations of different

antimicrobial drugs. Each one was evaluated in a serial dilution according to the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (22) with ampicillin, ceftriaxone, ceftiofur, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim 19:1, chloramphenicol, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, and nitrofurantoin. For quality control of the antimicrobial susceptibility test, the following reference strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Escherichia coli* ATCC25922.

The detection of antimicrobial resistance genes was detected by multiply PCR analyses. At this stage were primarily selected strains that were resistant to 2nd and 3rd generation cephalosporins and last generation quinolones, employed in the treatment of invasive salmonellosis. Extraction and quantification of DNA were made using Qiagen kit. The sequences of forward and reverse primers used as indicators for the detection of gene cassettes encoding resistance were those described by Pitout et al. (23) for quinolones and Olesen et al. (24) for  $\beta$ -lactamases. Those primers set generated amplicons of 516pb, 469pb, 417pb, 320pb for PMQR; 920pb for  $Bla_{cmv}$ ; 250pb for *aac(3')IIa*; 482pb for *aac(6')IB*; 250pb for Integrase; 500pb for Integron and 593pb for  $Bla_{CTXm}$  (25)

For molecular analyses, the bacterial suspension was embedded in agarose, lysed, washed, and digested with the restriction enzyme, 30U *XbaI* over 2 hours at 37 °C essentially as described in the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA) “One- Day” (24–28h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) (26, 27).

## Results

The isolation of *Salmonella* spp. occurred in three samples, a prevalence of 2,75%. As a result of serotyping the isolates were *Salmonella* ser. Typhimurium (O:4,5,12:i:1,2) in a Temminck's Seedeater (*Sporophila falcirostris*) (Figure 1) and, in a different apprehension, *Salmonella* ser. Panama (O:9,12:l,v:1,5) in two specimens of Chestnut-capped Blackbird (*Chrysomus ruficapillus*) that were kept together in the same cage. All the birds are passerines and had no symptoms of disease.

Antibiotic resistance was confirmed in all the three *Salmonella* isolates. All of them had resistance to multiple antibiotics, ranging from 3 to 8 antibiotics (Table 1). Resistance to ceftriaxone and ceftiofur was prevalent in all the isolates. The highest resistance profile was in one of the *Salmonella* ser. Panama isolates, that showed resistance to ampicillin, ceftraxone, ceftiofur, tetracycline, chloramphenicol, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin and enrofloxacin, and contained *aac(3)IIa* gene. None of the others antimicrobial resistance genes tested were detected in the *Salmonella* strains.

In the analysis of the results obtained by PFGE, *Salmonella* ser. Typhimurium sample showed 100% of similarity with two strains from human source, isolated later in south Brazil, indicating that the strain is already circulating in the country (BRJPXX01.042) (Figure 2). The two strains of *Salmonella* ser. Panama showed the same clonal origin and compared with samples from the database isolated from different sources, showed no common ancestry, and that the two birds have the same origin and a common source of infection (Figure 3).

Table 1: *Salmonella* isolated from wildbirds in CETAS and tested form antibiotic resistance, March 2011 to March 2012.

<i>Salmonella</i>	Host species	Antibiotic resistance*											Total
		AMP	CRO	CEF	TCY	SXT	CHL	GEN	NAL	CIP	ENR	NIT	
Serovar Typhimurium	Temminck's Seedeater	I	R	R	R	S	S	S	R	S	R	I	5
Serovar Panamá	Chestnut-capped Blackbird	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	8
Serovar Panamá	Chestnut-capped Blackbird	S	R	R	S	S	S	R	S	S	I	I	3

\* AMP= ampicillin; CRO= ceftriaxone; CEF= ceftiofur; TCY= tetracycline; SXT= sulfamethoxazole/trimethoprim; CHL= chloramphenicol; GEN= gentamicin; NAL= nalidixic acid; CIP= ciprofloxacin; ENR= enrofloxacin; NIT= nitrofurantoin

S= no resistance; I= intermediate; R= resistant



Figure 1: Temminck's Seedeater (*Sporophila falcirostris*) being sold in illegal wildlife trade.



Figure 2: Pulsed-field gel electrophoresis profile showing the four *XbaI* patterns of the *Salmonella* serovar Typhimurium strain identified from a Temminck's Seedeater faecal sample.

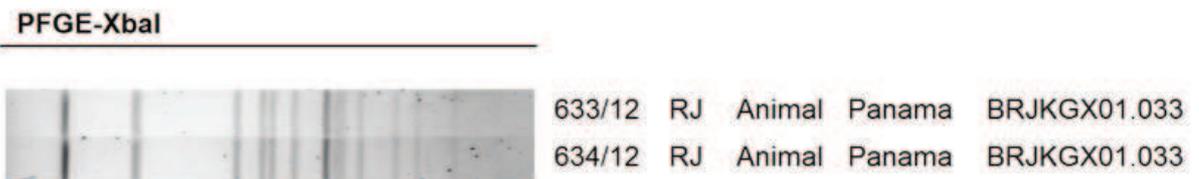


Figure 3: Pulsed-field gel electrophoresis profiles showing the four *XbaI* patterns of the two *Salmonella* serovar Panama strains identified from two Chestnut-capped Blackbird faecal sample showing the same clonal origin.

## Discussion

Low prevalence of *Salmonella* spp. rates has been found in samples from apparently healthy wild birds compared with studies from dead or dying ones (28, 13). Despite of the low detection rate in the animals sampled and the difficult to collect biological material from birds seized in the illegal wildlife trade, this signals that the serovars isolated circulate in bird's natural population. Several studies reveal that *Salmonella* ser. Typhimutium and *Salmonella* ser. Panama circulate in Brazil and in another countries, and can be isolated from human and animal source (29, 30).

Temminck's Seedeater (*Sporophila falcirostris*) is an endemic species of Atlantic Rain Forest that inhabits higher altitudes and has a granivorous feeding habit. The serovar Typhimurium was considered very frequent in outbreaks that affected men and livestock, especially poultry, until the 1990s (31). Chestnut-capped Blackbird (*Chrysomus ruficapillus*) is a species with wide distribution in Brazil and inhabits grasslands and flooded areas and feeds on insects, arthropods, small vertebrates and fruits. The serovar Panama is not very frequently isolated in epizooties and human outbreaks in Brazil (31).

Serovar Typhimurium is frequently associated with disease in many different mammalian and avian host species (17). Outbreaks of *Salmonella* ser. Typhimurium infections in humans, having the contact with wild passerine birds as a common source have been described in Norway (32) and in New Zealand (33). In this case, contact with dead birds, sick people and ingestion of contaminated food were responsible for the infection. Epizooties of salmonellosis by *Salmonella* ser. Typhimurium were identified in birds in Norway between 1999 and 2000, causing the death of several birds (34). Since 1973, *Salmonella* ser. Typhimurium has been isolated from dead passerines in U.S. (35). In this country, study conducted by Hall and Saito (36) showed that this same serovar was primarily responsible for mortality events in wild birds between 1985 and 2004, and the sources of infection were fecal-oral, social and feeding behaviour routes of transmission. Between 1995 and 2008, several cases of salmonellosis by *Salmonella* ser. Typhimurium were diagnosed in birds in Scotland (37). Other outbreaks have been reported in Canada (38), New Zealand, Sweden and the United Kingdom, and the birds can be a source of salmonella infection to other animal species, including man (28, 39). All this outbreaks occurred in temperate countries, in feeding places, where birds could be infected by fecal-oral transmission. In Brazil, people do not have the habit of feeding

birds, and those animals decompose rapidly in tropical conditions. Moreover, in several other countries like U.S., Norway and Sweden, they have better programs for disease control than Brazil, having greater ability to detect epizootic events.

The results of PFGE analyses of the three strains of *Salmonella* isolated indicate that all of them circulate in birds in Brazil. The strain of *Salmonella* ser. Typhimurium showed 100% of similarity with two strains isolated from a foodborne disease outbreak in south Brazil, pointing the risk to be associated with epizooties and outbreaks in humans. The strains of *Salmonella* ser. Panama did not showed common ancestry when compared with samples isolated from different sources in Brazil, perhaps because researches involving wild birds are rare and were never associated with epizooties and outbreaks in humans (31).

All of isolates showed multi-resistant patterns, and the resistance profiles alert for the importance of a surveillance program to prevent impacts on public health. It must be noted that all the isolates were resistant to ceftiofur and ceftriaxone, 3rd generation cephalosporins, the first used in veterinary medicine and the other used to treat severe human *Salmonella* infections. The *aac(3)IIa* isolated in one of the *Salmonella* ser. Panama mediate resistance to gentamicin. Despite the resistance to multiple antibiotics the other genes that could mediate the resistance, were not detected. According to Hilbert et al. (16), wild birds can acquire and disseminate *Salmonella* infection, including resistant strains, by direct contact with food producing animals, with species that can act as vectors, like insects, rodents and another birds and by contact with humans activities, like contaminated food and human waste. In these cases they can act as reservoir or vectors of resistant bacterial pathogens.

PFGE can be an important tool to distinguish *Salmonella* strains in epidemiological studies, helping to monitor and clarify the source of infections. The traffic of wildlife species in Brazil can be the source of human salmonellosis outbreaks and can facilitate the dissemination of resistant *Salmonella* through situations offered by captive management, as maintaining birds in overcrowded cages and offering contaminated food, which may become a problem for the conservation of natural populations and to public health.

## Literature Cited

1. Mittermeier RA, Fonseca GAB, Rylands AB, Brandon, Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade*. 2005;1(1): 14-21.
2. Alves RRN, Lima JRF, Araujo, HFP. The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conserv Int*. 2012;1-13.
3. Fernandes-Ferreira H, Mendonça SV, Albano C, Ferreira FS, Alves RRN. Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. *Biodivers Conserv*. 2012;21: 221-244.
4. Marini MA, Garcia FI. Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade*. 2005;1(1): 95-102.
5. Ribeiro LB, Silva MG. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura*. 2007;59(4): 4-5.
6. Regueira RFS, Bernard E. Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol Conserv*. 2012;149: 16-22.
7. Redford KH. The empty Forest. *BioScience*. 1992;42(6): 412-422.
8. Chomel BB, Belotto A, Meslin F. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infec Dis*. 2007;13(1): 6-11.
9. Karesh WB, Cook RA, Bennett EL, Newcomb J. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infec Dis*. 2005;11(7): 1000-1002.
10. Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis*. 2004;40 (4): 639-659.
11. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. *J Infection*. 2008;56: 83-98.
12. Benskin CM, Wilson K, Jones K, Hartley IR. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009;84: 349-73.
13. Abulreesh HH, Goulder R, Scott GW. Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. *Ringing & Migration*. 2007;23: 193–200.

14. Silva MA, Marvulo MFV, Mota RA, Silva JCR. The role of order Ciconiiformes in the epidemiological chain of *Salmonella* spp. for public health and biological diversity conservation. *Pesquisa Vet Brasil*. 2010;30(7):573-580.
15. Álvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int J Food Microbiol*. 2012;153: 281–287.
16. Hilbert F, Smulders FJM, Chopra-Dewasthaly R, Paulsen P. *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int*. 2012;45: 603–608.
17. Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschäpe H, Adams LG, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*. 2002;70(5): 2249-2255.
18. Skov MN, Madsen JJ, Rahbek C, Lodal J, Jespersen JB, Jørgensen JC, et al. Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. *J Appl Microbiol*. 2008;105: 1558–1568.
19. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal Samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(3): 1394–1404.
20. Matias CAR, Oliveira VM, Rodrigues DP, Siciliano S. Summary of the bird species seized in the illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil. *TRAFFIC Bulletin*. 2012;24(2): 83-86.
21. Grimont PAD, Weill FX. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; 2007.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility*. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA; 2012.
23. Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6′)-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemoth*. 2008;61: 999–1002.

24. Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of  $\beta$ -Lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist*. 2004;10(4): 334-340.
25. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahn D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin modifying enzyme. *Antimicrob Agents Ch*. 2006;50(11): 3953-3955.
26. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3: 59-67.
27. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [Internet]. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2013 – [cited 2013 June 18]. Available from: <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
28. Tizard I. Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2004;13(2): 50-66.
29. Bessa MC, Costa M, Cardoso M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do rio Grande do Sul. *Pesquisa Vet Brasil*. 2004;24(2): 80-84.
30. Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, et al. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2011;151: 307–313.
31. Hofer E, Filho SJS, Reis EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Vet Brasil*. 1997;17(2): 55-62.
32. Kapperud G, Stenwig H, Lassen J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway. *Am J Epidemiol*. 1998;147(8): 774-782.
33. Thornley CN, Simmons GC, Callaghan ML, Nicol CM, Baker MG, Gilmore KS, et al. First incursion of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT160 into New Zealand. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(4): 493-495.

34. Refsum T, Vikoren T, Handeland K, Kapperud G, Holstad G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella typhimurium* infection in passerine birds in Norway. *J Wildl Dis.* 2003;39(1): 64-72.
35. Locke LN, Shillinger RB, Jarred T. Salmonellosis in passerine birds in Maryland and West Virginia. *J Wildl Dis.* 1973;9:144-145.
36. Hall AJ, Saito EK. Avian wildlife mortality events due to Salmonellosis in the United States, 1985-2004. *J Wildl Dis.* 2008;44(3): 585-593.
37. Pennycott TW, Mather HA, Bennett G, Foster G. Salmonellosis in garden birds in Scotland, 1995 to 2008: geographic region, *Salmonella enterica* phage type and bird species. *Vet Rec.* 2010;166: 419-421.
38. Daoust P, Busby DG, Ferns L, Goltz J, McBurney S, Poppe C, et al. Salmonellosis in songbirds in the Canadian Atlantic provinces during winter-summer 1997-98. *Can Vet J.* 2000;41: 54-59.
39. Lawson B, Howard T, Kirkwood JK, Macgregor SK, Perkins M, Robinson RA, et al. Epidemiology of salmonellosis in garden birds in England and Wales, 1993 to 2003. *EcoHealth.* 2010;7: 294-306.

Address for Correspondence: Carlos Alexandre Rey Matias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil; email: [camatias@ufrj.br](mailto:camatias@ufrj.br)

## 6. Capítulo - Vibrionaceae e Aeromonadaceae em aves silvestres apreendidas no comércio ilegal

### Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds from the illegal wildlife trade in Rio de Janeiro

*Artigo em revisão*

Carlos Alexandre Rey Matias<sup>1,2,4</sup>, Roberta Laine de Souza<sup>3</sup>, Emily Moraes Roges<sup>3</sup>, Dália dos Prazeres Rodrigues<sup>3</sup> e Salvatore Siciliano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório Nacional de Referência de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup> Corresponding author (email: [camatias@ufrj.br](mailto:camatias@ufrj.br))

#### Resumo

Muitos microorganismos, incluindo espécies de *Vibrio* e *Aeromonas*, habitam naturalmente o ambiente aquático e algumas podem ser patogênicas para os animais e para o homem. O presente estudo avalia a presença de Vibrionaceae e Aeromonadaceae em aves silvestres apreendidas no comércio ilegal no estado do Rio de Janeiro e o seu risco para a saúde pública. Amostras provenientes da cloaca foram obtidas de 109 aves pertencentes a 30 espécies, sendo as mais frequentes aquelas das famílias Emberezidae e Thraupidae. O material coletado foi enriquecido em Água Peptonada Alcalina (APA) contendo 1% de cloreto de sódio (NaCl) e APA contendo 3% de NaCl (37<sup>o</sup>C/18-24 horas). Posteriormente as amostras foram semeadas em placas de TCBS e de ágar GSP (37<sup>o</sup>C/18-24 horas). Colônias suspeitas foram bioquimicamente caracterizadas, tendo resultados negativos para Vibrionaceae e Aeromonadaceae, indicando que as espécies de aves silvestres apreendidas no comércio ilegal não são reservatórios importantes dessas bactérias.

## Abstract

Several microorganisms, including *Vibrio* and *Aeromonas* species naturally inhabit the aquatic environment and some of them may be pathogenic to animals and men. The present study evaluates the presence of Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds seized in illegal trade in Rio de Janeiro State and its risk to public health. Cloacal samples were obtained from one hundred-and-nine birds, representing 30 species, being the highest frequency from the families Emberezidae and Thraupidae. The collected material was enriched at Alkaline Peptone Water (APW) containing 1% sodium chloride (NaCl) and APW containing 3% NaCl (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Thereafter, samples were streaked onto Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) and onto *Pseudomonas-Aeromonas* Seletive Agar Base (GSP Agar) plates (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Suspected colonies were biochemically characterized. There was no Vibrionaceae and Aeromonadaceae bacterial isolation indicating that wild bird species poached in illegal trade are not important reservoirs of these bacteria.

**Key-words:** wild birds, Vibrionaceae, Aeromonadaceae.

Bacteria from Vibrionaceae and Aeromonadaceae families naturally inhabit the aquatic environment that includes marine, estuarine and freshwater, and are constantly associated with infectious diseases in humans and animals. *Vibrio* and *Aeromonas* species have clinical importance for men and are involved in gastroenteritis and wound infections that can result in septicemia. In Brazil, the presence of those microorganisms is associated with aquatic animals and they are considered opportunistics, triggering localized and systemic diseases when in stressful situations (Pereira et al., 2008; Moura et al., 2012).

Birds are susceptible to various bacterial pathogens common to men and domestic animals, and other organisms with pathogenic potential. Studies involving the microbiota of wild birds are rare or limited to a small number of animals, and those evaluating the prevalence of enterobacteria are limited to certain groups such as seagulls, being *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp., the etiological agents of interest. Most of the studies involving passerines occur after outbreaks with high mortality, providing no information on the prevalence of apparently

healthy animals. Thus, the role of these birds as vectors of bacterial pathogens may be underestimated (Kruse et al 2004; Benskin et al. 2009). Infections due to species of the Vibrionaceae as *Vibrio cholerae* and Aeromonadaceae as *Aeromonas* spp, also represent theoretical potential for disease transmission from birds to humans (Tsiodras et al 2008).

In the context of Public Health, birds are important because they can adduce agents of emerging zoonoses, either as hosts or as mechanical carriers of infectious agents (Halpern et al. 2008). Wild birds are among the main victims of trafficking in wild animals (Alves et al., 2012; Matias et al., 2012). Among the consequences of this illegal activity, the risk of infectious diseases transmission has to be considered, because the captivity provides greater contact between different species and between them with men (Chomel et al., 2007; Alves et al., 2012; Fernandes-Ferreira et al., 2012). This situation can lead to outbreaks not only in men, but in livestock, in wildlife populations and threaten ecosystems health (Karesh et al 2005; Chomel et al 2007).

The present study aims to evaluate the presence of Vibrionaceae and Aeromonadaceae in wild birds seized in illegal trade in Rio de Janeiro State and its risk to public health.

Wild birds specimens were sampled on arrival, at Rehabilitation Center of Wild Animals (CETAS-RJ) in Rio de Janeiro, Brazil, after being confiscated in illegal trade markets by the police from March 2011 to March 2012 (Figure 1). Cloacal samples were obtained from birds chosen randomly in a total of nine apprehensions. One hundred-and-nine birds, representing 30 species were chosen according to the diversity of species in each one, being the highest frequency from the families Emberezidae and Thraupidae (Table 1). Samples were taken by clinic procedures, using swabs introduced into Cary Blair Medium under refrigeration conditions to Enterobacteria Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute (LRNEB – IOC/FIOCRUZ), in Rio de Janeiro, Brazil for microbiological assays in order to culture and isolate Vibrionaceae and Aeromonadaceae.



Figure 1: A Creamy-bellied Thrush (*Turdus amaurochalinus*) and a Maroon-bellied Parakeet (*Pyrrhura frontalis*) seized in illegal street markets in Rio de Janeiro (Brazil).

Table 1: Wild birds sampled in CETAS, Rio de Janeiro (Brazil) from March, 2011 to March, 2012.

Family	Eating habit	Specie	Total
Emberizidae	Granivorous	<i>Sicalis flaveola</i>	15
		<i>Volatinia jacarina</i>	11
		<i>Sporophila caerulea</i>	11
		<i>Sporophila</i> sp.	8
		<i>Zonotrichia capensis</i>	5
		<i>Sporophila frontalis</i>	3
		<i>Sporophila falcirostris</i>	3
		<i>Sporophila angolensis</i>	2
		<i>Sporophila lineola</i>	1
		<i>Coryphospingus pileatus</i>	1
Thraupidae	Frugivorous	<i>Tangara sayaca</i>	5
		<i>Tangara ornata</i>	4

		<i>Ramphocelus bresilius</i>	3
		<i>Paroaria dominicana</i>	3
		<i>Tachyphonus coronatus</i>	1
Cardinalidae	Granivorous	<i>Saltator similis</i>	6
		<i>Saltator maximus</i>	1
		<i>Cyanoloxia brissonii</i>	1
Icteridae	Omnivorous	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	8
		<i>Gnorimopsar chopi</i>	3
		<i>Molothrus bonariensis</i>	1
Turdidae	Omnivorous	<i>Turdus rufiventris</i>	4
		<i>Turdus albicollis</i>	1
		<i>Turdus amaurochalinus</i>	1
Psittacidae	Granivorous	<i>Pyrrhura frontalis</i>	1
		<i>Aratinga leucophthalma</i>	1
		<i>Amazona aestiva</i>	1
Fringillidae	Frugivorous	<i>Euphonia chlorotica</i>	2
Estrildidae	Granivorous	<i>Estrilda astril</i>	1
Tyrannidae	Omnivorous	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1

---

The collected material was enriched at Alkaline Peptone Water (APW) containing 1% sodium chloride (NaCl) and APW containing 3% NaCl (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Thereafter, samples were streaked onto Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) and onto *Pseudomonas-Aeromonas* Seletive Agar Base (GSP Agar) plates (37<sup>0</sup>C/18-24 hours). Representatives of all distinct colonies were picked onto sorting means (Kligler Iron Agar and Lysine Iron Agar) and onto Nutrient Broth plus 1% NaCl. The oxidase positive colonies were submitted to biochemical tests: susceptibility to O/129 vibriostatic agent (2,4 diamino-6, 7 diisoprylpteridine), ONPG production ( $\alpha$

nitrophenyl- $\beta$ -D galactopyranoside), VP (Voges-Proskauer), glucose, sucrose, arabinose and mannose fermentation, lysine and ornithine, decarboxylase and arginine dehydrolase susceptibility in order to obtain the conclusive strain identification (FDA, 1992).

The same bird specimens were sampled for microbiological assays in order to culture and isolate bacteria of the family Enterobacteriaceae and Staphylococcaceae.

Hundreds of bacterial species can be either pathogenic or have a potential to trigger diseases under favorable conditions. All the birds have their own microflora and those with pathogenic potential are found in a diverse range of habitats, from tropical to cool temperature climates. However, there was no Vibrionaceae and Aeromonadaceae bacterial isolation in wild birds samples seized in illegal street markets, although other microorganisms with pathogenic potential, like *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. and *Staphylococcus* spp. were isolated in some frequency.

Among the bacterial species, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* are the main pathogenic species isolated from salt water; *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae* are those found in freshwater (Jayasinghe et al. 2008). *V. parahaemolyticus* has a global distribution in aquatic environment and it is an important pathogen of fish and shellfish (Pereira et al. 2007a; Jayasinghe et al. 2008). It is possible that waterfowl may be responsible for disseminating *V. cholerae* from water bodies (Halpern et al. 2008).

*Aeromonas* spp., besides inhabit the aquatic environment, can be found in the intestinal tract of reptiles and marine mammals, which can trigger both infectious processes in these animals and in men (Cubas et al. 2006, Pereira et al. 2008). *Aeromonas aeruginosa* mainly affects the upper respiratory tract of birds and also may cause septicemia and enteric hemorrhage in psittacids and mortality in other wild birds (Benskin et al. 2009). It accounts for 13% of diagnosed gastroenteritis in the United States (Kingombe et al. 1999, Cubas et al. 2006). *Aeromonas hydrophila* is regarded as a facultative pathogen in poultry (Glünder & Siegmann 1989).

In the case of *A. hydrophila*, Glünder & Siegmann (1989) shown that the frequency of isolation is influenced by the bird habitat, being higher in aquatic than in terrestrial birds. Furthermore, this also seems to be influenced by diet, and the

carnivorous may support intestinal colonisation by *Aeromonas* spp. This is true, specially for aquatic birds that are constantly exposed to infections.

The fact that none of Vibrionaceae and Aeromonadaceae bacteria have been isolated can be partly explained because the specimens analysed were terrestrial birds that have sporadic contact with the aquatic environment. The number of birds sampled were smaller when compared with the results of Glünder & Siegmann (1989), that isolated 3,4% of *A. hydrophila* in organ segments and parts of intestines of 609 terrestrial birds after post mortem examination. Differently, our research used cloacal swab samples.

This indicates that wild bird species poached in illegal trade are not important reservoirs of these bacteria. Nevertheless, the risk should be considered when species that live in aquatic environments and wetlands are seized or if they have had contact with contaminated water or food.

#### References

- Alves RRN, Lima JRF, Araújo HFP (2012) The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conserv Int*1-13.
- Benskin CMH, Wilson K, Jones K, Hartley IR (2009) Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev*84: 349–373.
- Chomel BB, Belotto A, Meslin F (2007) Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis*13(1): 6-11.
- Fernandes-Ferreira H, Mendonça SV, Albano C, Ferreira FS, Alves RRN (2012) Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. *Biodivers Conserv*21: 221-244.
- Food and Drug Administration (FDA) (1992) *Bacteriological analytical manual*. 7th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Va.
- Glünder G, Siegmann O (1989) Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in wild birds. *Avian Pathology*18: 685-695.
- Halpern M, Senderovich Y, Izhaki I (2008) Waterfowl - The missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathogens*4(10): 1-3.

Karesh WB, Cook RA, Bennett EL, Newcomb J (2005) Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infect Dis*11(7): 1000-1002.

Kruse H, Kirkemo A, Handeland K (2004) Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg Infect Dis*10(12): 2067-2072.

Matias CAR, Oliveira VM, Rodrigues DP, Siciliano S (2012) Summary of the birds species seized in the illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil. *TRAFFIC Bull*24(2): 83-86.

Moura JF, Souza, RL, Roges EM, Siciliano S, Rodrigues DP, (2012) Marine environment ad public health. *In: Gbolagade Akeem Lameede (Eds). Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World. 1ed. Rijeka: InTech, 2012, c. 11 , p. 263-284.*

Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Siciliano S, Moreno IMB, Ott PH, Rodrigues DP (2008) *Plesiomonas shigelloides* and Aeromonadaceae family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern brazilian coast. *Braz J Microbiol*39: 749-755.

Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME (2008) Human infections associated with wild birds. *J Infection*56: 83-98.

## 7. Capítulo - Presença de *Staphylococcus* isolados em aves silvestres no Rio de Janeiro

### *Staphylococcus* isolados em aves silvestres no Rio de Janeiro, Brasil - relevância para a Saúde Pública

*Artigo Submetido a Revista Panamericana de Saúde Pública: (2014)*

Carlos A.R. Matias<sup>1,2</sup>, Ingrid A. Pereira<sup>3</sup>, Sabrina P. Oliveira<sup>3</sup>, Norma S. Lázaro<sup>3</sup>, Dália P. Rodrigues<sup>3</sup>, Salvatore Siciliano<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório Nacional de Referência de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

#### Resumo

**Objetivo.** Investigar a prevalência de *Staphylococcus* em aves silvestres apreendidas no comércio ilegal e seus padrões de resistência antimicrobiana, avaliando desta forma sua relevância para a Saúde Pública.

**Métodos.** *Swabs* de cloaca foram coletados de 109 aves silvestres apreendidas no Rio de Janeiro, Brasil, onde estavam sendo comercializadas ilegalmente. O material biológico foi submetido a análise microbiológica visando o isolamento de *Staphylococcus* spp. A resistência aos antimicrobianos foi avaliada pelo Método de Difusão de Disco em Ágar e através da pesquisa de marcadores genéticos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.

**Resultados.** *Staphylococcus* foram isolados em 45,9% das amostras coletadas, sendo representados por espécies coagulase-positivas e coagulase-negativas. Trinta e nove (78,0%) isolados foram resistentes a um ou mais dos nove antimicrobianos testados. A resistência foi mais elevada a ampicilina, oxacilina, clindamicina, tetraciclina e cefoxitina, e ausente para vancomicina. Dezoito padrões diferentes de resistência foram observados. A presença dos genes *mecA* e *blaZ* foi avaliada. Um *Staphylococcus mecA*-positivo era sensível a oxacilina e a todos os outros antimicrobianos avaliados. Foram isoladas cepas com padrão de multirresistência nas quais tanto o gene *mecA* quanto o *blaZ* foram detectados.

**Conclusões.** O isolamento de espécies de *Staphylococcus* que não tem as aves silvestres como hospedeiros naturais, a elevada proporção de cepas com graus de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, lincosamidas e tetraciclina, e ainda a presença de genes de resistência associada a fenótipos de multirresistência sugere que esses animais podem ter papel relevante na transmissão desses patógenos e na disseminação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: aves silvestres, tráfico de animais, *Staphylococcus* spp., resistência antimicrobiana.

Autor para correspondência:

C. A. R. Matias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7, CEP: 23890-000, Seropédica- RJ, Brazil. E-mail: camatias75@gmail.com; camatias@ufrjr.br

## Introdução

O tráfico de animais silvestres é considerado a atividade ilegal mais lucrativa no mundo, superada somente pelo tráfico de armas e de drogas (1, 2, 3). Pelas leis brasileiras, é considerado crime ambiental a captura de animais silvestres e sua manutenção em cativeiro sem a permissão legal. Como o Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade (4), as aves em especial, são capturadas ilegalmente para o comércio nacional e internacional (5, 6).

Aves silvestres e espécies migratórias podem atuar como vetores na transmissão de diferentes microorganismos, além de ter um papel na dispersão de patógenos emergentes e re-emergentes (7, 8, 9). Dentre as consequências do comércio ilegal de animais silvestres, o risco de transmissão de doenças deve ser considerado, uma vez que o cativeiro propicia um maior contato entre espécimes, favorecendo a transmissão de agentes infecciosos (10, 11). A manipulação desses animais e de seus dejetos representam um risco para aqueles profissionais envolvidos no seu manejo em cativeiro.

O trato gastrointestinal dos animais apresenta uma rica microbiota que inclui bactérias do gênero *Staphylococcus*, que são agentes etiológicos de diversas doenças nos animais, como doenças supurativas, mastites, artrites e infecções do trato urinário,

como consequência de diferentes fatores de virulência, tais como a produção de enzimas e toxinas (12, 13, 14). Algumas espécies fazem parte da microbiota normal da pele e das mucosas dos animais e do homem, como *Staphylococcus intermedius*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, além de *S. saprophyticus* e outros *Staphylococcus* coagulase-negativos, que podem atuar como patógenos oportunistas, especialmente quando os hospedeiros se encontram em condições de baixa imunidade (15, 16).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas no intuito de avaliar o padrão de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. Esses estudos têm mostrado que esses organismos são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos. A emergência e disseminação da resistência antimicrobiana é um problema tanto na medicina veterinária quanto humana, representando um desafio mundial, pois muitas infecções envolvem cepas resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis (17). Isso é especialmente importante entre as espécies de *Staphylococcus*, que estão associadas a infecções resistentes aos antimicrobianos em animais domésticos e de produção e estão envolvidos na epidemiologia de infecções no homem (18, 19, 20).

O propósito do presente estudo é investigar a prevalência das espécies de *Staphylococcus* em aves silvestres de diferentes famílias e hábitos alimentares, apreendidas no comércio ilegal. Os padrões de resistência antimicrobiana também foram avaliados, assim como os marcadores genéticos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.

## Material e Métodos

### *População*

As aves silvestres foram apreendidas em feiras de rua onde ocorre o comércio ilegal de animais silvestres no Rio de Janeiro (6) e foram trazidas para o CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) no Rio de Janeiro, Brasil. *Swabs* de cloaca foram obtidos num total de nove apreensões, entre o período de Março de 2011 a Março de 2012. Cento e nove aves, representando 30 espécies foram escolhidas aleatoriamente de acordo com a diversidade de cada apreensão, sendo a maioria representantes das famílias Emberezidae e Thraupidae (Tabela 1). As amostras foram obtidas através de procedimentos clínicos usando *swabs* e transportadas em meio Cary Blair<sup>®</sup> sob refrigeração até o Laboratório de Enterobactérias/ Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, para as análises microbiológicas.

Tabela 1: Aves silvestres submetidas a *swab* de cloaca no CETAS, Rio de Janeiro (Brasil) entre março de 2011 a março de 2012.

Família	Hábito alimentar	Espécies	Total
Emberezidae	Granívoro	<i>Sicalis flaveola</i>	15
		<i>Volatinia jacarina</i>	11
		<i>Sporophila caerulescens</i>	11
		<i>Sporophila</i> sp.	8
		<i>Zonotrichia capensis</i>	5
		<i>Sporophila frontalis</i>	3
		<i>Sporophila falcirostris</i>	3
		<i>Sporophila angolensis</i>	2
		<i>Sporophila lineola</i>	1
Thraupidae	Frugívoro	<i>Coryphospingus pileatus</i>	1
		<i>Tangara sayaca</i>	5
		<i>Tangara ornata</i>	4
		<i>Ramphocelus bresilius</i>	3
		<i>Paroaria dominicana</i>	3
		<i>Tachyphonus coronatus</i>	1

Cardinalidae	Granívoro	<i>Saltator similis</i>	6
		<i>Saltator maximus</i>	1
		<i>Cyanoloxia brissonii</i>	1
Icteridae	Onívoro	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	8
		<i>Gnorimopsar chopi</i>	3
		<i>Molothrus bonariensis</i>	1
Turdidae	Onívoro	<i>Turdus rufiventris</i>	4
		<i>Turdus albicollis</i>	1
		<i>Turdus amaurochalinus</i>	1
Psittacidae	Granívoro	<i>Pyrrhura frontalis</i>	1
		<i>Aratinga leucophthalma</i>	1
		<i>Amazona aestiva</i>	1
Fringillidae	Frugívoro	<i>Euphonia chlorotica</i>	2
Estrildidae	Granívoro	<i>Estrilda astril</i>	1
Tyrannidae	Onívoro	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1

---

#### *Identificação de Staphylococcus*

Todas as amostras biológicas foram enriquecidas em caldo Muller Hinton e depois semeadas em caldo BHI e isoladas em Ágar Manitol Salgado. De acordo com as colorações de Gram e com as características morfológicas, testes fenotípicos foram

realizados para distinguir as espécies de *Staphylococcus* em coagulase-positivas e coagulase-negativas, incluindo o teste da catalase, a prova da coagulase e susceptibilidade a bacitracina e novobiocina. Testes bioquímicos complementares foram realizados como a detecção de hemólise em ágar sangue, produção de acetoina, DNase e Termonuclease, urease, redução a nitrato, ornitina descarboxilase e provas de fermentação de maltose, frutose, xilose, arabinose, rafinose e trealose, dentre outros carboidratos (21).

#### *Método de Difusão de Disco em Ágar*

As cepas foram avaliadas usando o Método de Difusão de Disco em Ágar preconizado pelo CLSI. A leitura e interpretação dos diâmetros são estabelecidos de acordo com o CLSI e atualizados anualmente (14). Os representantes das classes de drogas antimicrobianas (OXOID<sup>®</sup>) usadas incluíram  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, oxacilina, cefoxitina), macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina), quinolonas (ciprofloxacina), tetraciclina (tetraciclina), aminoglicosídeos (gentamicina) e glicopeptídeos (vancomicina). *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *Escherichia coli* ATCC25922 foram usadas como controle de qualidade.

#### *Susceptibilidade à oxacilina e produção de $\beta$ -lactamase*

A resistência a oxacilina foi determinada de acordo com os testes fenotípicos recomendados pelo CLSI (14). Foi aplicado o Teste de Difusão de Disco usando discos (OXOID<sup>®</sup>) de oxacilina (1  $\mu$ g) e cefoxitina (30  $\mu$ g), e o teste de agar screen em Agar Müller Hinton contendo 6  $\mu$ g/ml de oxacilina. As amostras usadas para garantir o controle de qualidade foram *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25293 e *S. aureus* ATCC 43300. O teste do disco de Nitrocefín foi usado para detectar cepas de *Staphylococcus* spp. que produzem a  $\beta$ -lactamase cromogênica, de acordo com os padrões recomendados pelo CLSI (14).

### *PCR e a extração de DNA de Staphylococcus spp.*

A presença dos genes *mecA* e *blaZ* em todas as amostras, foi investigada pela técnica de PCR usando primers e protocolos de amplificação previamente descritos para isolados de *Staphylococcus* spp. (22). Resumidamente, o DNA foi extraído de culturas overnight em 10mL de caldo BHI. Células bacterianas foram coletadas por centrifugação por 30 segundos a 14 000 rpm, lavadas em 1 mL de tampão TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl), e recentrifugadas. O sedimento foi resuspenso em 400 µL de tampão TE incluindo 5 µL de lisostafina (concentração stock 1 mg/mL; Sigma-Aldrich®) e incubados por 30 minutos a 37°C. A lise foi completada pela incubação em água por 10 minutos a 100°C. A resistência à oxacilina devido à expressão de PBP2a regulada pelo gene *mecA* foi detectada pela amplificação dos primers: 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTGGC-3' e 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'. A regulação da produção de β-lactamases pelo gene *blaZ* foi detectada pela amplificação dos primers: 5'TACAACGTGTAATATCGGAGG3' e 5'-CATTACACTCTTGGCGGTTT-3' (639pb); 5'-TCTATCTCAATGACATATAG-3' e 5'-GAGGCTTCAATGACATATAG-3' (737 pb) como descrito por Rosato, Craig & Archer (23). A reação ocorreu num volume final de 20 µL da mistura contendo tampão PCR (10 mM TrisHCl, pH 9,0; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada um dos desoxinucleotídeos, 3,0 µM de cada primer gene-específico, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Promega®, Madison, WI) e 5 µL do modelo. Os produtos foram analisados por eletroforese através de 0.8-1.5% agarose seguido pela impregnação com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL), e visualizado num UV Transilluminator ImageQuant® (13).

### *Análises estatísticas*

As distribuições das frequências dos isolados de *Staphylococcus* spp. e das amostras resistentes aos antimicrobianos por cada ave de acordo com o hábito alimentar foram determinadas e comparadas usando o Teste Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher. *P* valores menores ou iguais a 0,05 foram considerados significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS, versão 17.0 (SPSS 17.0 for Windows; Chicago, USA).

## Resultados

*Staphylococcus* foi detectado em 45,9% (50 de 109) das amostras, representados por espécies coagulase-positivas (CoPS): *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* spp. *coagulans* e por espécies coagulase-negativa (CoNS): *S. sciuri*, *S. gallinarum* seguidas por outras espécies como observado na Tabela 2. Considerando o hábito alimentar não houve diferença significativa na prevalência, que variou de 47,2% (34 de 72) nas aves granívoras, 38,9% (7 de 18) nas aves frugívoras, e 47,3% (9 de 19) nas aves onívoras ( $P=0,809$ ) (Tabela 2). A prevalência de *Staphylococcus* spp. foi significativamente maior entre as espécies de aves mais comuns, Canário-da-terra ( $n=15$ ), Coleiro-papa-capim ( $n=11$ ), e Tiziu ( $n=11$ ), pelo Teste Exato de Fisher ( $P=0,002$ ).

O resultado dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 50 isolados de *Staphylococcus* spp. estão resumidos na Tabela 3. Não houve diferença significativa nas prevalências das amostras resistentes de acordo com o hábito alimentar das aves, pelo Teste Exato de Fisher ( $P=0,62$ ). Os tamanhos das amostras foram muito pequenas para comparar a resistência entre as espécies de aves silvestres. Trinta e nove (78,0%) isolados foram resistentes a um ou mais dos nove agentes antimicrobianos testados. A resistência foi considerada alta para ampicilina (32,1%), oxacilina (15,6%), clindamicina (11,9%), tetraciclina (11,9%) e cefoxitina (10,1%), mas baixa para gentamicina (4,6%), eritromicina (3,6%), ciprofloxacina (0,9%), e ausente para vancomicina. Dezoito padrões de resistência diferentes foram observados. O padrão de resistência mais comum foi a resistência a ampicilina, em 35,9% (14/39) e a ampicilina-oxacilina que ocorreu em 10,2% (4/39) das cepas resistentes (Tabela 4).

A detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR correu em 22,0% (11/50) dos isolados de *Staphylococcus* entre as espécies: *S. aureus* (2/11), *S. intemedius* (2/11), *S. schleiferi* spp. *coagulans* (1/11), *S. sciuri* (5/11). A presença do gene *blaZ* foi detectada em 24,0% (12/50) dos isolados, representados por *S. aureus* (2/12), *S. sciuri* (5/12), *S. gallinarum* (1/12), *S. carnosus* (1/12), *S. xylosus* (1/12), *S. haemolyticus* (1/12), *S. hyicus* (1/12). Uma amostra de *Staphylococcus mecA* positiva era sensível à oxacilina e apresentou sensibilidade a todos os antibióticos avaliados. Em alguns isolados com multi-resistência aos antimicrobianos foi possível detectar tanto o gene *mecA* quanto o gene *blaZ* (Tabela 4).

Os testes fenotípicos para oxacilina detectaram 44,0% (22/50) de isolados resistentes em pelo menos um dos testes realizados, mas apenas seis amostras foram fenotipicamente resistentes à oxacilina e *mecA* positivos. O teste do disco de Nitrocefin detectou 28,0% (14/50) de *Staphylococcus* produtores de  $\beta$ -lactamases, enquanto nove deles foram *blaZ* positivos.

Tabela 2: Frequência de *Staphylococcus* spp. isolados das aves silvestres de acordo com o hábito alimentar.

<i>Staphylococcus</i> isolados	Granívoros <sup>a</sup> n=72 (%)	Frugívoros <sup>b</sup> n=18 (%)	Onívoros <sup>c</sup> n=19 (%)	Total n=109 (%)
<i>S. aureus</i>	7 (9,7)	2 (11,1)	3 (15,8)	12 (11,0)
<i>S. intermedius</i>	1 (1,4)	1 (5,5)	2 (10,5)	4 (3,6)
<i>S. xylosus</i>	1 (1,4)	0 (0)	1 (5,2)	2 (1,8)
<i>S. sciuri</i>	9 (12,5)	1 (5,5)	0 (0)	10 (9,2)
<i>S. gallinarum</i>	3 (4,1)	0 (0)	0 (0)	3 (2,7)
<i>S. chromogenes</i>	1 (1,4)	0 (0)	1 (5,2)	2 (1,8)
<i>S. saccharolyticus</i>	1 (1,4)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)
<i>S. lugdunensis</i>	1 (1,4)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)
<i>S. carnosus</i>	1 (1,4)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)
<i>S. hyicus</i>	2 (2,8)	0 (0)	0 (0)	2 (1,8)
<i>S. hominis</i>	1 (1,4)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)
<i>S. schleiferi coagulans</i>	2 (2,8)	0 (0)	1 (5,2)	3 (2,7)
<i>S. simulans</i>	1 (1,4)	1 (5,5)	0 (0)	2 (1,8)

<i>S. haemolyticus</i>	1 (1,4)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)
CoNS	2 (2,8)	2 (11,1)	1 (5,2)	5 (4,6)
<i>Staphylococcus</i> spp.	34 (47,2)	7 (38,9)	9 (47,3)	50 (45,9)

<sup>a</sup> Granívoros: Famílias Emberezidae, Cardinalidae, Estrildidae, Psittacidae.

<sup>b</sup> Frugívoros: Famílias Thraupidae, Fringillidae.

<sup>c</sup> Onívoros: Famílias Icteridae, Turdidae, Tyrannidae.

Tabela 3: Resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp. das aves silvestres, de acordo com o hábito alimentar.

Hábito alimentar	No. (%) resistentes	No. <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a:								
		AMP	TCY	FOX	OXA	GEN	VAN	CIP	ERI	CLI
Granívoros	27 (79,4)	24 (33,3)	9 (12,5)	5 (6,9)	10 (13,9)	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,4)	3 (4,1)	7 (9,7)
Frugívoros	6 (85,7)	5 (27,8)	3 (16,6)	5 (27,8)	5 (27,8)	3 (16,6)	0 (0)	0 (0)	1 (5,5)	4 (22,2)
Onívoros	6 (66,7)	6 (31,6)	1 (5,2)	1 (5,2)	2 (10,5)	1 (5,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10,5)
Total	39 (78,0)	35 (32,1)	13 (11,9)	11 (10,1)	17 (15,6)	5 (4,6)	0 (0)	1 (0,9)	4 (3,6)	13 (11,9)

AMP= ampicilina; TCY= tetraciclina; FOX= cefoxitina; OXA= oxacilina; GEN= gentamicina; VAN= vancomicina; CIP= ciprofloxacina; ERI= eritromicina; CLI= clindamicina

Tabela 4: Padrões de resistência antimicrobiana e distribuição dos genes *mecA* e *blaZ* de *Staphylococcus* spp. isolados de aves silvestres.

Padrões de resistência	Nº (%)	Nº	Nº	Nº
	Isolados resistentes	<i>mecA</i> + <i>blaZ</i> -	<i>mecA</i> + <i>blaZ</i> +	<i>mecA</i> - <i>blaZ</i> +
AMP	14 (35,9)	4	2	2
AMP-OXA	4 (10,2)	1	2	1
AMP-TCY	3 (7,7)	-	-	1
TCY	2 (5,1)	-	-	1
AMP-OXA-FOX- CLI-TCY	2 (5,1)	-	-	-
AMP-OXA-FOX- CLI-GEN	2 (5,1)	-	1	-
OXA-FOX-CLI-GEN	2 (5,1)	-	-	-
AMP-ERI	1 (2,5)	-	-	1
AMP-CLI	1 (2,5)	-	-	-
AMP-OXA-TCY	1 (2,5)	-	-	-
AMP-CLI-OXA	1 (2,5)	-	-	-
AMP-CLI-TCY-OXA	1 (2,5)	-	-	-
AMP-FOX- ERI-TCY	1 (2,5)	-	-	-
AMP-OXA-FOX- ERI-CLI	1 (2,5)	-	-	-
AMP-OXA-FOX- CIP-CLI-TCY	1 (2,5)	-	-	1
AMP-OXA-FOX- ERI-CLI-TCY	1 (2,5)	-	-	-
AMP-OXA-FOX- CLI-GEN-TCY	1 (2,5)	-	-	-

Total	39 (100)	5	5	7
Sensível	11	1	-	-

AMP= ampicilina; TCY= tetraciclina; FOX= cefoxitina; OXA= oxacilina; GEN= gentamicina; VAN= vancomicina; CIP= ciprofloxacina; ERI= eritromicina; CLI= clindamicina

## Discussão

A literatura prévia aponta para o padrão de algumas espécies de *Staphylococcus* na microbiota normal de seres humanos e de alguns animais, mas há pouca informação a respeito desta microbiota em aves silvestres. Bangert et al. (24) isolaram *S. epidermidis* nas fezes de psitacídeos, *S. aureus* foi isolado nas fezes de aves marinhas, de corvídeos e de aves migratórias (7). Brittingham et al. (25) pesquisaram a prevalência de algumas bactérias presentes em *swabs* de cloaca de passeriformes e de pica-paus e isolaram *Staphylococcus* em 15,0% deles. Comparando com os resultados do presente estudo, em que em 45,9% das amostras cloacais houve o isolamento de *Staphylococcus* spp., nossa prevalência foi maior.

A prevalência de *S. aureus* é relevante devido ao seu potencial patogênico e padrão de transmissão em algumas circunstâncias, como aquelas previstas para acontecer no caso da captura de aves silvestres em seus habitats, em condições de cativeiro, na contaminação fecal do ambiente e contato íntimo com seres humanos. Kloos & Bannerman (15) e Stepán et al. (16) descreveram que *S. aureus* faz parte da microbiota do homem, de outros mamíferos e de aves. Outros CoPS isolados, como *S. intermedius*, também estão relacionado aos mamíferos e as aves, mas no caso de *S. schleiferi* spp. *coagulans* é naturalmente restrito aos cães (26).

As espécies CoNS isoladas têm importância patogênica. A maioria delas foi previamente considerada como comensal, mas atualmente muitos estudos as reconhecem como causa importante de infecção no homem e um dos grupos de microorganismos mais frequentemente isolados nos laboratórios de microbiologia clínica (15, 27, 28). *S. haemolyticus*, isolado de um espécime, tem a capacidade de infectar feridas epiteliais, o trato urinário e de desencadear endocardite e bacteremia. Além disso, o isolamento de *S. hominis* foi observado, e algumas subspecies estão

envolvidas em casos de infecções multirresistentes no homem. *S. sciuri*, que pode causar infecções em feridas e peritonite, foi prevalente em 9,2% dos isolados (29, 16). Outras espécies de CoNS como *S. lugdunensis*, mesmo com baixo percentual de isolamento merecem atenção, devido a sua característica oportunista, sendo associado com endocardite e septicemia no homem. *S. sciuri* e *S. gallinarum*, ambos isolados no presente estudo, estão relacionados as aves, mas outros CoNS também isolados, como *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. carnosus* e *S. haemolyticus*, tem o homem e mamíferos domésticos como hospedeiros naturais (26). O isolamento de microorganismos que não têm as aves como hospedeiros naturais pode indicar que esses animais, apesar de sua origem selvagem, poderiam ter tido contato com animais domésticos e com o homem. Como eles são capturados para o comércio ilegal, o isolamento dessas cepas parece plausível, considerando as condições sanitárias e de manejo no tráfico de animais silvestres.

Há pouca informação a respeito dos padrões de resistência aos antimicrobianos em amostras de animais silvestres. Nascimento et al. (30), em uma pesquisa sobre resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas de aves silvestres da Mata Atlântica brasileira mostraram que a incidência de resistência bacteriana a um ou mais antibióticos varia de 97,0% a 36,0%. Nosso resultado, apesar de ser em bactérias Gram-positivas foi de 78,0%. Aves mantidas em compartimentos superlotados, em condições sanitárias precárias, sem ventilação e com temperaturas inadequadas sofrem de estresse severo, favorecendo a transmissão de doenças. Teuber (31) achou em torno de 50,0% de resistência a penicilina e ampicilina em isolados de *S. aureus* e de CoNS oriundos de casos de mastite bovina. O presente estudo mostrou um padrão de resistência desse tipo em torno de 36,0% nos isolados de aves.

O aumento da resistência antimicrobiana ocorre devido ao seu uso indiscriminado. Muito disso ocorre na medicina humana, mas o uso excessivo em animais, incluindo a sua administração em animais de produção como promotores de crescimento é um grande problema. Alguns estudos têm demonstrado a transmissão de patógenos multirresistentes entre espécies, incluindo o homem (32, 33). O surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) de tornou um problema de Saúde Pública em todo o mundo, com cepas resistente sendo isoladas de seres humanos e de uma variedade de espécies animais, como cavalos, animais de companhia e de produção (34). Esse é o caso de MRSA transmitido de suínos para o homem e do isolamento de cepas resistentes a penicilina, lincomicina, eritromicina, pristinamicina,

kanamicina e pefloxacina (32). A resistência à penicilina surgiu em *S. aureus* logo após a sua introdução. Depois esse patógeno adquiriu resistência à meticilina, as penicilinas de terceira geração e mais recentemente à vancomicina (33).

Price et al. (35) sugeriram pela tipificação da sequência genética que o MRSA associado aos animais de produção se originou como *S. aureus* susceptível à meticilina em seres humanos. A concentração de animais e do homem em ambientes próximos pode aumentar o potencial de transmissão desses microorganismos entre membros da mesma ou de diferentes espécies de hospedeiros (32, 35). A prevalência de 11 *mecA* e de 12 *BlaZ* isolados de *Staphylococcus* spp. apoia a teoria de uma ampla disseminação de genes de resistência em uma variedade de ecossistemas, incluindo os animais silvestres como reservatórios. O contato com seres humanos e a contaminação ambiental por cepas resistentes pode ser o foco de disseminação. Outras espécies além de *S. aureus* foram *mecA* e *BlaZ* positivas, e isso inclui CoNS. Isso sugere que a disseminação por mecanismos genéticos horizontais no trato gastrointestinal pode ocorrer de modo eficaz entre esses reservatórios ou pode ser uma questão de aquisição de resistência aos antimicrobianos a partir de cepas do meio ambiente. Também foi possível observar que a presença de genes de resistência está associada ao perfil de resistência a múltiplas drogas antimicrobianas, pois muitas amostras se mostram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina e quinolonas, por mecanismos como a alteração da permeabilidade da membrana ou através da produção de  $\beta$ -lactamases.

O impacto da utilização de agentes antimicrobianos da indústria animal na saúde dos animais silvestres permanece desconhecido (36). A presença de resistência aos antimicrobianos no ambiente selvagem pode evidenciar o impacto das atividades humanas em ecossistemas naturais. Lemus et al. (37) demonstraram a presença de resíduos de quatro diferentes antibióticos em aves silvestres e a associação com seu estado de saúde e mortalidade. O uso intensivo dessas drogas e a sua presença em aves silvestres pode ter sérias implicações na conservação de das espécies e na emergência e disseminação de patógenos resistentes no meio ambiente.

O isolamento de espécies de *Staphylococcus* que não são comumente isoladas de aves silvestres, a elevada proporção de cepas com graus de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, lincosamidas e tetraciclina, e ainda a presença dos genes *mecA* e *blaZ* que têm sido associados com o fenótipo de multirresistência, demonstra que esses animais podem ter

papel relevante na transmissão desses patógenos e na disseminação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos através das fronteiras nacionais e internacionais do tráfico de animais silvestres. Estudos efetuados no ambiente natural, incluindo a avaliação de profissionais envolvidos no manejo de animais são fundamentais para uma melhor investigação da origem de cepas resistentes isoladas de animais silvestres.

**Agradecimentos:** Os autores gostariam de agradecer o suporte do CNPq, da FAPERJ (Proc.E- 26/110.630/2011), do Curso de pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e aos técnicos de laboratório do Laboratório de Enterobactérias (LABENT-IOC).

#### Referências

1. Ferreira CM, Glock L. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociencias (Porto Alegre)* (On-line) 2006; 12.
2. Lima R. O tráfico de animais silvestres. In: RENCTAS, eds. *Vida silvestre: o estreito limiar entre preservação e destruição - Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Mata Atlântica: Corredores Central e Serra do Mar*. Dupligráfica: Brasília; 2007: 44-49.
3. Ribeiro LB, Silva MG. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura* 2007; 59, 4-5.
4. Mittermeier RA, Fonseca GAB, Rylands AB, Brandon K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade* 2005; 1, 14-21.
5. Alves RRN, Nogueira EEG, Araujo HFP, Brooks SE. Bird-keeping in the Caatinga, NE Brazil. *Hum Ecol* 2010; 38, 147-156.
6. Matias CAR, Oliveira VM, Rodrigues DP, Siciliano S. Summary of the bird species seized in the illegal trade in Rio de Janeiro. *Traffic Bulletin* 2012; 24 (2), 83-86.
7. Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 2004; 40, 639-59.

8. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. *J Infect* 2008; 56, 83-98.
9. Benskin CM, Wilson K, Jones K, Hartley IR. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009; 84, 349-73.
10. RENCTAS. *1º Relatório nacional sobre o tráfico da fauna silvestre*, 2001. Rede Nacional Contra o Tráfico de Animais Silvestres, Brasília.
11. Fernandes-Ferreira H, Mendonça SV, Albano C, Ferreira FS, Alves RRN. Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. *Biodiversity and conservation* 2012; 1-24.
12. Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MA, Teixeira LM. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 4214-22.
13. Coelho SMO, Moraes RAM, Soares LC, Pereira IA, Gomes LP, Souza MMS. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais; Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. *Cienc rural* 2007; 37, 195-200.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility*. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA; 2013.
15. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7, 117-40.
16. Stepán J, Pantůček R, Doskar J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol (Praha)* 2004; 49, 353-86.
17. Lubelchek RJ, Weinstein RA. Antibiotic resistance and nosocomial infections. In: Kenneth HM, Pizer HF, eds. *The social ecology of infectious diseases*. San Diego: Academic Press; 2008: 241-274.

18. Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A, Smith H, Stevens KB, Lloyd DH. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56, 692–697.
19. Aquino GV, Mulata RP, Ávila FA. Prevalence of Methicillin-resistant Staphylococci on a farm: staff can harbour MRS when animals do not. *Zoonoses Public Health* 2012; 59, 1-3.
20. Weese JS, Hannon SJ, Booker CW, Gow S, Avery BP, Reid-Smith RJ. The prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in feedlot cattle. *Zoonoses Public Health* 2012; 59, 144-147.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Gram-positive cocci: Part I: Staphylococci and related Gram-positive cocci. In: Winn Jr W, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, eds. *Koneman's color, atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008: 623-671.
22. Senna JPM, Pinto CA, Carvalho LPS, Santos DS. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the mec hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J clin microbiol* 2002; 40, 2254-2256.
23. Rosato AE, Craig WA, Archer GL. Quantitation of mecA transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Bacteriol* 2003; 185, 3446-52.
24. Bangert RL, Cho BR, Widders PR, Stauber EH, Ward AC. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Dis* 1988; 32, 46-52.
25. Brittingham MC, Temple SA, Duncan RM. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *J Wildl Dis* 1988; 24, 299-307.  
*Perspect* 2007; 115, 313-6.
26. Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* 1980; 34, 559-92.

27. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* 1999; 50, 223-36.
28. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 4947-55.
29. Werckenthin C, Cardoso M, Martel J, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res* 2001; 32, 341–362.
30. Nascimento AMA, Cursino L, Gonçalves-Dornelas H, Reis A, Chartone-Souza E, Marini MA. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in birds from the Brazilian Atlantic Forest. *The Condor* 2003; 105, 358-361.
31. Teuber M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56, 755-763.
32. Gilchrist MJ, Greko C, Wallinga DB, Beran GW, Riley DG, Thorne PS. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environ Health Perspect* 2007; 115(2): 313-6.
33. Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB. Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 2009; 4, 231-238.
34. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol* 2010; 300, 109-17.
35. Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I, Battisti A, Franco A, Zmudzki J, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F, Keim P, Skov R, Aarestrup FM. *Staphylococcus aureus* CC398:

host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 2012; 3.

36. Blanco G, Lemus JA, Grande J, Gangoso L, Grande JM, Donázar JA, Arroyo B, Frías O, Hiraldo F. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ Microbiol* 2007; 9, 1738-49.
37. Lemus JA, Blanco G, Grande J, Arroyo B, García-Montijano M, Martínez F. Antibiotics threaten wildlife: circulating quinolone residues and disease in Avian scavengers. *PLoS One* 2008; 3, e1444.

## 8. Discussão

O Rio de Janeiro é considerado um dos maiores centros de comércio ilegal de animais silvestres no Brasil, para onde são destinados animais que irão suprir o mercado interno e internacional do tráfico de animais selvagens (Carvalho 1985; Lima 2007). Esta atividade ocorre, geralmente, em feiras livres, onde todas as aves expostas não têm autorização legal para a venda.

O perfil das aves que foram avaliadas quanto a presença de enterobactérias é similar aos resultados obtidos por diversos autores (Ferreira & Glock 2004; Efe et al. 2006; Fernandes-Ferreira et al. 2012), nos quais a maioria é pertencente à ordem dos Passeriformes, especialmente da família Emberizidae. Os coleiros (*Sporophila* spp.) estão entre os espécimes mais apreendidos e já vêm sendo listados entre as espécies mais predominantes dentre as aves comercializadas em feiras livres ou mantidas como animais de companhia (Fernandes-Ferreira et al. 2012). Outros estudos em diversos estados brasileiros, além de reportarem os coleiros, apontam para a presença do Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) entre as espécies mais comuns (Ferreira & Glock 2004; Pereira & Brito 2005; Costa 2005; Fernandes-Ferreira et al. 2012; Alves et al. 2010). Ambas as espécies estiveram entre aquelas com o maior número de indivíduos avaliados no estudo.

Embora a maioria das espécies de aves confiscadas tenha ampla distribuição geográfica no país, algumas como o Galo-da-campina (*Paroaria dominicana*) e o Bigodinho (*Sporophila lineola*) não ocorrem naturalmente no Rio de Janeiro. Isso sugere que muitos espécimes são capturados em outras regiões do país e em seguida são trazidos para a venda no estado. Este fato tem relevância para o risco de disseminação de doenças infecciosas devido ao contato entre diferentes espécies envolvidas no tráfico (Karesh et al. 2005) e a soltura irresponsável ou acidental de espécies que podem introduzir doenças no ambiente natural (Efe et al. 2006; Alves et al. 2010; Fernandes-Ferreira et al. 2012).

Em relação à prevalência de bactérias da família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* foi aquela com maior frequência de isolamento, sendo significativamente maior nos psitacídeos do que nos Passeriformes. Esse microorganismo está entre os mais abundantes na microbiota normal do intestino dos animais e do homem (Gopee et al. 2000) e tem sido isolado em diversas espécies de aves, incluindo passeriformes (Benskin et al. 2009). Porém, a prevalência é maior em

espécies com hábito alimentar carnívoro ou onívoro e menor naquelas com hábito alimentar granívoro como a maioria dos Passeriformes do estudo (Steele et al. 2005). Esta maior prevalência pode ser explicada pelas condições sanitárias precárias as quais os animais são submetidos após serem capturados na natureza.

Cepas de *E. coli* enteropatogênicas têm sido isoladas de aves silvestres saudáveis ou doentes e podem carrear cepas resistentes aos antimicrobianos (Hubálek 2004). Das cinco cepas isoladas que carregavam o gene *eaeA*, uma carregava simultaneamente o gene *stx2*. A presença de ambos os genes classifica a cepa como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) ou enterohemorrágica (EHEC).

A baixa prevalência de *Salmonella* spp. isolada está de acordo com outros estudos que envolviam aves silvestres aparentemente saudáveis (Tizard 2004; Abulreesh et al. 2007). Apesar disso, e da dificuldade de coletar material biológico de aves apreendidas no comércio ilegal, os resultados apontam que os sorovares isolados circulam entre a população de aves silvestres. Muitos estudos revelam que *Salmonella* sor. Typhimurium e *Salmonella* sor. Panama circulam no Brasil e em outros países, e podem ser isolados de amostras biológicas de origem humana e animal (Bessa et al. 2004; Loureiro et al. 2010; Kich et al. 2011).

*Salmonella* sor. Typhimurium está frequentemente associada com doença em diferentes espécies de hospedeiros mamíferos e aves e foi considerada muito frequente em surtos que afetaram o homem e os animais de produção, especialmente frangos, até a década de 1990 (Hofer et al. 1997; Rabsch et al. 2002). Surtos em seres humanos envolvendo este sorovar, tendo o contato com pássaros silvestres como fonte de infecção, têm sido descritos em muitos países da Europa, nos EUA e na Nova Zelândia (Kapperud et al. 1998; Refsum 2003; Thornley et al. 2003). O sorovar Panama não é frequentemente isolado em epizootias e em surtos envolvendo seres humanos no Brasil (Hofer et al. 1997).

Os resultados das análises por PFGE indicam que ambos os sorovares circulam em aves silvestres no país. A cepa de *Salmonella* sor. Typhimurium apresentou 100% de similaridade com duas cepas isoladas posteriormente de um surto de infecção alimentar em humanos no sul do Brasil, apontando para o risco de estar associado com epizootias e surtos humanos. As de *Salmonella* sor. Panama apresentaram a mesma origem clonal, mas não apresentaram nenhuma origem ancestral comum quando comparadas com as cepas da Base de Dados Nacional do PULSENET (LRNEB/IOC).

Uma possível explicação é porque pesquisas envolvendo aves silvestres são escassas e este sorovar raramente está associado com epizootias (Hofer et al. 1997). Além disso, sua ocorrência em nosso meio somente foi relatada em 2009, porém pertencente a clone distinto daquele detectado na presente investigação.

Algumas das enterobactérias isoladas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morganii*, podem causar doença no homem e estão frequentemente associadas a infecções nosocomiais (Steele et al. 2005). A resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas tem sido relatada em outros estudos envolvendo aves silvestres (Tsubokura et al. 1995; Nascimento et al. 2003; Steele et al. 2005; Hasan et al. 2012). A resistência à ampicilina está consistente com os resultados obtidos por Tsubokura et al. (1995), Nascimento et al. (2003) e Steele et al. (2005), assim como a resistência ao ceftiofur (Steele et al. 2005). Particularmente o ceftiofur, pertencente ao grupo das cefalosporinas de 3ª geração, tem sua utilização principalmente em aves de produção como profilaxia de infecções respiratórias. É importante notar o número cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes, sendo ambos os microorganismos envolvidos em infecções nosocomiais (Steele et al. 2005).

O perfil de resistência alerta para a importância de um programa de monitoramento para prevenir possíveis impactos na Saúde Pública. É importante ressaltar que grande número dos isolados, bem como as três cepas *Salmonella* foram resistentes ao ceftiofur e a ceftriaxona, ambas cefalosporinas de 3ª geração. Particularmente o ceftiofur, de uso veterinário, tem sua utilização principalmente em aves de produção como profilaxia de infecções respiratórias e a ceftriaxona, é importante opção terapêutica para o tratamento de infecções graves por *Salmonella* no homem. O gene *aac(3)IIa* isolado de uma das cepas de *Salmonella* sor. Panama media resistência a gentamicina. Apesar dos três isolados de *Salmonella* apresentarem multi-resistência, outros genes que poderiam mediar resistência não foram detectados.

A presença de resistência aos antimicrobianos em animais selvagens pode evidenciar o impacto das atividades humanas nos ecossistemas naturais (Blanco et al. 2007). Aves silvestres podem adquirir e disseminar enterobactérias, incluindo cepas resistentes, através da via fecal-oral, pelo contato com espécies que podem atuar como vetores, como insetos, roedores e outras aves, e pelo contato com atividades antrópicas, como alimentos contaminados e dejetos humanos. Nesses casos eles podem atuar como

reservatórios ou vetores de enteropatógenos resistentes (Steele et al. 2005; Hilbert et al. 2012).

O fato de nenhuma bactéria das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae ter sido isolada pode ser parcialmente explicado pelo fato das espécies analisadas não serem aves aquáticas ou marinhas. Além disso, o número de indivíduos amostrados foi pequeno quando comparado com os resultados obtidos por Glünder & Siegmann (1989), que isolaram 3,4% de *A. hydrophila* em diversos órgãos de 609 aves terrestres após sua necropsia. Diferentemente, os resultados negativos foram obtidos a partir de *swab* de cloaca. Isso indica que as aves silvestres apreendidas comumente no comércio ilegal não parecem ser reservatórios importantes desses microorganismos. No entanto, o risco deve ser considerado quando espécies que têm contato com áreas úmidas forem apreendidas ou quando tiverem contato com água de beber ou alimentos contaminados.

Quanto a presença de *Staphylococcus* a prevalência foi de 45,9%, considerada elevada quando comparada aos resultados obtidos por Brittingham et al. (1988) que pesquisaram algumas bactérias presentes em *swabs* de cloaca de passeriformes e de pica-paus, e isolando *Staphylococcus* em 15,0% deles.

A prevalência de *S. aureus* é relevante devido ao seu potencial patogênico e padrão de transmissão em algumas circunstâncias, como aquelas previstas para acontecer no caso da captura de aves silvestres em seus habitats, em condições de cativeiro, na contaminação fecal do ambiente e contato íntimo com seres humanos. Outros CoPS isolados, como *S. intermedius*, também estão relacionados aos mamíferos e as aves, mas no caso de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* é naturalmente restrito aos cães (Kloos 1980).

As espécies CoNS isoladas têm importância patogênica. *S. haemolyticus*, isolado de um espécime, tem a capacidade de infectar feridas epiteliais, o trato urinário e de desencadear endocardite e bacteremia. Além disso, o isolamento de *S. hominis* foi observado, e algumas subespécies estão envolvidas em casos de infecções multirresistentes no homem. *S. sciuri*, que pode causar infecções em feridas e peritonite, foi prevalente em 9,2% dos isolados (Werckenthin et al. 2001; Stepán et al. 2004). Outras espécies de CoNS como *S. lugdunensis*, mesmo com baixo percentual de isolamento merecem atenção, devido a sua característica oportunista, sendo associado com endocardite e septicemia no homem. *S. sciuri* e *S. gallinarum*, ambos isolados no presente estudo, estão relacionados as aves, mas outros CoNS também isolados, têm o

homem e mamíferos domésticos como hospedeiros naturais (Huebner & Goldmann 1999). O isolamento de microorganismos que não têm as aves como hospedeiros naturais pode indicar que esses animais, apesar de sua origem selvagem, têm contato com animais domésticos e com o homem. Como eles são capturados para o comércio ilegal, o isolamento dessas cepas parece plausível, considerando as condições sanitárias e de manejo no tráfico de animais silvestres.

A resistência aos antimicrobianos foi detectada em 78,0% das amostras de *Staphylococcus*. Teuber (1999) achou em torno de 50,0% de resistência a penicilina e ampicilina em isolados de *S. aureus* e de CoNS oriundos de casos de mastite bovina. O presente estudo mostrou um padrão de resistência desse tipo em torno de 36,0% nos isolados de aves.

A concentração de animais e do homem em ambientes próximos pode aumentar o potencial de transmissão desses microorganismos entre membros da mesma ou de diferentes espécies de hospedeiros, favorecendo dessa forma a transmissão de patógenos multirresistentes entre espécies, incluindo o homem (Gilchrist et al. 2007; Price et al. 2012). A prevalência de 11 *mecA* e de 12 *BlaZ* isolados de *Staphylococcus* spp. apoia a teoria de uma ampla disseminação de genes de resistência em uma variedade de ecossistemas, incluindo os animais silvestres como reservatórios. Outras espécies além de *S. aureus* foram *mecA* e *BlaZ* positivas, incluindo CoNS. Isso sugere que a disseminação por mecanismos genéticos horizontais no trato gastrointestinal pode ocorrer de modo eficaz entre esses reservatórios ou pode ser uma questão de aquisição de resistência aos antimicrobianos a partir de cepas do meio ambiente. Também foi possível observar que a presença de genes de resistência está associada ao perfil de resistência a múltiplas drogas antimicrobianas, pois muitas amostras se mostram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas e quinolonas, através de mecanismos como a alteração da permeabilidade da membrana ou através da produção de  $\beta$ -lactamases.

## 9. Considerações Finais

O presente trabalho contribuiu para avaliar o papel das aves silvestres comercializadas ilegalmente pelo tráfico de animais silvestres no estado do Rio de Janeiro, como reservatórios de diversos enteropatógenos e seu potencial risco para a Saúde Pública. Ressalta-se que alguns dos microorganismos isolados são agentes de zoonoses e apresentam perfil de multi-resistência aos antimicrobianos.

No capítulo 3 buscou-se traçar o perfil das principais espécies de aves silvestres que são comercializadas ilegalmente no Rio de Janeiro, através de apreensões que ocorreram em feiras livres durante o período de um ano. Os dados obtidos, serviram de orientação para definir o universo amostral das coletas realizadas para determinar a prevalência de enterobactérias. A maior parte das aves apreendidas são pertencentes a ordem Passeriformes, com destaque para as famílias Emberezidae e Thraupidae. O Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), Tiziu (*Volatinia jacarina*) e Coleiro-papa-capim (*Sporophila caerulea*) estão entre as principais vítimas do tráfico e foram as que em maior número tiveram amostras coletadas.

O capítulo 4 avaliou a frequência de isolamento de bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae na avifauna apreendida, onde a prevalência foi de 78,6%. Diferentes bactérias por indivíduo foram isoladas, com destaque para *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, além de *Salmonella* spp. Os isolados avaliados apresentaram um elevado percentual de resistência aos antimicrobianos, sendo que algumas amostras chegaram a apresentar resistência a nove dos antibióticos testados, com destaque ao elevado percentual de resistência a nitrofurantoína, ao ceftiofur, a ampicilina e a ceftriaxona. Ficou claro o potencial que o comércio ilegal de animais silvestres apresenta para a disseminação de enteropatógenos com perfil de resistência a drogas antimicrobianas, pondo em risco a conservação de espécies na natureza e a saúde de todos os profissionais envolvidos no seu manejo.

No capítulo 5 foram investigadas as três amostras de *Salmonella* isoladas das aves silvestres, todas passeriformes: uma *Salmonella* sorovar Typhimurium e duas *Salmonella* sorovar Panama. Apesar da baixa prevalência, os resultados demonstraram que estes sorovares circulam no Brasil, o que foi reforçado com a análise por PFGE. Utilizando esta metodologia e consultando a Base de Dados Nacional do PULSENET (LRNEB/IOC), foi avaliado comparativamente o perfil detectado com isolados de surtos em diversas regiões do Brasil, envolvidas em surtos de origem animal, alimentar e

humana. A cepa de *Salmonella* sorovar Typhimurium mostrou 100% de similaridade com duas amostras envolvidas em surtos de origem humana, apontando para o risco de associação com epizootias e surtos de origem humana. Esta técnica demonstrou ser uma importante ferramenta na distinção de cepas de *Salmonella* em estudos epidemiológicos, ajudando a monitorar e esclarecer fontes de infecção. Quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, todas as três amostras apresentaram multi-resistência, incluindo cefalosporinas de 3ª geração. Tais resultados apontam a relevância em coibir o tráfico de animais silvestres, o qual pode representar uma fonte de disseminação para a salmonelose e ser responsável inclusive por surtos humanos.

No capítulo 6 foi avaliado o potencial que as aves silvestres apreendidas no comércio ilegal podem ter para disseminar bactérias das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae. Nenhum desses microorganismos foi isolado nas amostras avaliadas, indicando que estas espécies de aves não são reservatórios importantes destas bactérias. Apesar disso, o risco para a Saúde Pública não deve ser descartado, uma vez que algumas espécies podem viver em áreas úmidas ou podem ter contato com alimentos e água contaminada.

O capítulo 7 investigou a prevalência de *Staphylococcus* em aves silvestres apreendidas no comércio ilegal e seus padrões de resistência antimicrobiana. *Staphylococcus* foram isolados em 45,9% das amostras, sendo representados por espécies coagulase-positivas e coagulase-negativas. O isolamento de espécies que não tem as aves silvestres como hospedeiros naturais, a elevada proporção de cepas com graus de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, lincosamidas e tetraciclina, e ainda a presença de genes de resistência associada a fenótipos de multi-resistência, sugere que esses animais podem ter papel relevante na transmissão desses patógenos e na disseminação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Com isso, recomenda-se que sejam implementadas políticas de integração entre os diversos órgãos e instituições envolvidas no combate ao tráfico de animais selvagens - incluindo os órgãos ambientais das diversas esferas governamentais – e os órgãos responsáveis pela vigilância em saúde. Isto inclui a implementação das seguintes medidas:

- Ações de longo prazo visando o combate ao tráfico de animais selvagens e a sua retirada da natureza, esclarecendo a população sobre os riscos sanitários da aquisição de espécimes de origem ilegal. Essas medidas

incluiriam táticas de inteligência na identificação de rotas do tráfico de animais e de regiões onde os animais são capturados na natureza, e medidas de educação ambiental desencorajando a população em capturar e adquirir os animais silvestres.

- Fazer valer as “Diretrizes e procedimentos para a soltura de espécimes da fauna silvestre nativa” da Instrução Normativa IBAMA nº 179/ 2008. Esta legislação preconiza a investigação clínica e diagnóstico dos animais a serem soltos, visando correto manejo sanitário e evitando a introdução de patógenos na natureza. O monitoramento contínuo das aves vítimas do tráfico de animais selvagens quanto a presença de enteropatógenos bacterianos seria indispensável, especialmente em relação a *Salmonella*, com a realização de procedimentos de quarentena para evitar que a soltura e destinação desses animais contribua para a disseminação de cepas com potencial zoonótico e/ou com perfil de multi-resistência bacteriana entre diversos ambientes e para o homem.
- Integrar os órgãos que atuam no manejo de aves silvestres apreendidas ao Centro de Informação em Saúde Silvestre coordenado pelo Programa Institucional Biodiversidade & Saúde da Fiocruz. Isso possibilitaria o envio de amostras biológicas de animais silvestres para a Rede de Laboratórios em Saúde Silvestre, o que possibilitaria o diagnóstico e monitoramento de zoonoses.
- Medidas de vigilância em saúde envolvendo o monitoramento de profissionais envolvidos no manejo de espécies silvestres, uma vez que a manipulação desses animais os expõe a maior contato com agentes zoonóticos e com microorganismos envolvidos em infecções nosocomiais.

## 10. Referências Bibliográficas

Abulreesh HH, Goulder R, Scott GW. Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. *Ringing & Migration*. 2007; 23: 193–200.

Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacterioses and mycoses. Washington DC: PAHO; 2003.

Álvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *Int J Food Microbiol*. 2012; 153: 281-287.

Alves RRN, Nogueira EEG, Araújo HFP, Brooks. SE Bird-keeping in the Caatinga, NE Brazil. *Hum Ecol*. 2010; 38: 147-156.

Alves RRN, Lima JRF, Araújo HFP. The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conser Int*. 2012; 1-13.

Barbosa JAA, Nóbrega VA, Alves RRN. Aspectos da caça e comércio ilegal da avifauna silvestre por populações tradicionais do semi-árido paraibano. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2010; 10(2): 39-49.

Bastos LF, Luz VLF, Reis IJ, Souza VL. Apreensão de espécimes da fauna silvestre em Goiás – situação e destinação. *Rev Biol Neotrop*. 2008; 5(2): 51-63.

Benskin CMH, Wilson K, Jones K, Hartley IR. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev*. 2009; 84: 349–373.

Bessa MC, Costa M, Cardoso M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do rio Grande do Sul. *Pesquisa Vet Brasil*. 2004; 24(2): 80-84.

Bezerra ARGF, Costa RC, Lins F, Silva MLP, Beleza GL, Montezoro P. Tráfico de animais selvagens: (II) variação anual de espécies recebidas no Centro de Triagem de Animais Silvestres. 2004a; Brasília (XXV Congresso Brasileiro de Zoologia).

Bezerra ARGF, Costa RC, Lins F, Ferreira VR, Oliveira CR, Magalhães RP. Tráfico de animais selvagens: (I) estudo das apreensões encaminhadas ao Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA. 2004b; Brasília (XXV Congresso Brasileiro de Zoologia).

Blanco G, Lemus JA, Grande J, Gangoso L, Grande JM, Donázar JA, et al. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ Microbiol.* 2007; 9: 1738-49.

Boerlin P, Reid-Smith RJ. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews.* 2008; 9(2): 115-126.

Brasil. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências, Pub. L. No 9.605 (DOU de 13/02/1998).

Brasil. Define as diretrizes e procedimentos para destinação dos animais da fauna silvestre nativa e exótica apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente às autoridades competentes, Pub. Instrução Normativa IBAMA No 179 (DOU de 25/06/2008).

Brittingham MC, Temple SA, Duncan RM. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *J Wildlife Dis.* 1988; 24(2): 299-307.

Bueno E. A viagem do descobrimento: a verdadeira história da expedição de Cabral. Rio de Janeiro: Objetiva; 1998.

Carvalho CES. Lista preliminar da fauna comercializada na Feira de Caxias – RJ. Boletim da FBCN. 1985; 20: 90-102.

CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). Lista das aves do Brasil. 2011. 10ª Edição. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em 20/04/2012.

Chomel BB, Belotto A, Meslin F. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. Emerg Infect Dis. 2007; 13(1): 6-11.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA; 2012.

Coelho SMO, Menezes RA, Soares LC, Pereira IA, Gomes LP, Souza MMS. Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. Ciência Rural. 2007; 37:195-200.

Cole D, Drum DJV, Stallknecht DE, White DG, Lee MD, Ayers S, et al. Free-living Canada Geese and Antimicrobial Resistance. Emerg Infect Dis. 2005; 11(6): 935-938.

Costa GA, Hofer E. Isolamento e identificação de enterobactérias [Monography]. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro; 1972.

Costa RGA. Comércio ilegal de aves silvestres em Fortaleza, Ceará. Atualidades Ornitológicas. 2005; 125:3.

Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2006.

Daszak P, Cunningham AA. Emerging infectious diseases – a key role for conservation medicine. In: Aguirre AA, editor. Conservation Medicine – Ecological health in practice. Oxford: University Press; 2002. p. 40-61.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Science. 2000; 287: 443-449.

Dean W. A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. São Paulo: Companhia das Letras; 1996.

Diaz P, Bello H, Dominguez M, Trabal N, Mella S, Zemelman R, Gonzalez GR. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Rev Med Chile. 2004; 132: 1173-1178.

Dorrestein GM. Medicine and Surgery of Canaries and Finches. In: Roskopf W, Woerpel R, editors. Diseases of Cage and Aviary Birds. Baltimore: Willian & Wilkins; 1996. p. 915-927.

Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MAVP, Teixeira LM. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. J Clin Microbiol. 2004; 42(9):4214-4222.

Efe MA, Martins-Ferreira C, Olmos F, Mohr LV, Silveira L F. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para a destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro. Revista Brasileira de Ornitologia. 2006; 14(10): 67-72.

Evans EE. Zoonotic diseases of common pet birds: Psittacine, Passerine and Columbiform species. Vet Clin Exot Anim. 2011; 14: 457-476.

Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray PR, editor. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 649-669.

Fernandes-Ferreira H, Mendonça SV, Albano C, Ferreira FS, Alves RRN. Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. Biodivers Conserv. 2012; 21: 221-244.

Ferreira CM, Glock L. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. Biociências. 2004; 12(1): 21-30.

Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological analytical manual. 7th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Va;1992.

Gama TP, Sassi R. Aspectos do comércio ilegal de pássaros silvestres na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Gaia Scientia. 2008; 2(2): 1-20.

Gilchrist MJ, Greko C, Wallinga DB, Beran GW, Riley DG, Thorne PS. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. Environ Health Perspect. 2007; 115(2): 313-6.

Glünder G, Siegmann O. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in wild birds. Avian Pathology. 1989; 18: 685-695.

Godoy SN, Matushima ER. A survey of diseases in Passeriforms birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo City, Brazil. J Avian Med Surg. 2010; 24(3): 199-209.

Gopee NV, Adesiyun AA, Caesar K. A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds and reptiles in Trinidad. *J Zoo Wildlife Med.* 2000; 31(3): 353-360.

Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th ed. France: Institute Pasteur; 2007. 167 pp.

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PAD, Weill FX. Supplement 2003-2007 to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 2010; 47:161. p. 26-29.

Guimarães MB. Passeriformes (Pássaro, Canário, Saíra, Gralha). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2006. p. 324-337.

Hall AJ, Saito EK. Avian wildlife mortality events due to Salmonellosis in the United States, 1985-2004. *J Wildlife Dis.* 2008; 44(3): 585-593.

Halpern M, Senderovich Y, Izhaki I. Waterfowl - The missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathogens.* 2008; 4(10): 1-3.

Hasan B, Sandegren L, Melhus A, Drobni M, Hernandez J, Waldenström J, Alam M, Olsen B. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(12): 2055-2058.

Hendriksen SWM, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, Van Duijkeren E. Animal-to-Human Transmission of Salmonella Typhimurium DT104A Variant. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10 (12): 2225-2227.

Hernandez EFT, Carvalho MS. O tráfico de animais silvestres no Estado do Paraná. *Acta Sci Human Soc Sci.* 2006; 28(2): 257-266.

Hilbert F, Smulders FJM, Chopra-Dewasthaly R, Paulsen P. *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int.* 2012; 45: 603–608.

Hofer E, Filho SJS, Reis EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Vet Brasil.* 1997; 17(2): 55-62.

Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildlife Dis.* 2004; 40(4): 639-659.

Hue SM. *Delícias do descobrimento: a gastronomia brasileira do Século XVI.* Rio de Janeiro: Jorge Zahar; 2008.

Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 1999; 50, 223-36.

Jayasinghe CVL, Ahmed SBN, Kariyawasam MGIU. The isolation and identification of *Vibrio* species in marine shrimps of Sri Lanka. *Journal of Food and Agriculture.* 2010; 1(1):36-44.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley, HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews. 2004; 2: 123-140.

Kapperud G, Stenwig H, Lassen J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway. Am J Epidemiol. 1998; 147(8): 774-782.

Karesh WB, Cook RA, Bennett EL, Newcomb J. Wildlife trade and global disease emergence. Emerg Infect Dis. 2005; 11(7): 1000-1002.

Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, et al. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. Int J Food Microbiol. 2011; 151: 307–313.

Kingombe CIB, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R, et al. PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(12): 5293-5302.

Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annu Rev Microbiol. 1980; 34, 559-92.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JR. Diagnóstico Microbiológico. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS; 2008.

Kruse H, Kirkemo A, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis. 2004; 10(12): 2067-2072.

Le Duc JP. Trafficking in animals and plants: a lucrative form of crime. *International Criminal Police Review – ICPR*. 1996; 458/459: 19-31.

Levy SM, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: cause, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement*. 2004; 10(12): 122-129.

Lima R. O tráfico de animais silvestres. In: RENCTAS, editors. *Vida silvestre: o estreito limiar entre preservação e destruição - Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Mata Atlântica: Corredores Central e Serra do Mar*. Brasília: Dupligráfica; 2007. p. 44-49.

Lopes PRD. Comércio de animais silvestres. *Bioikos*. 1991; 5(1): 49-56.

Loureiro ECB, Marques NDB, Ramos FLP, Reis EMF, Rodrigues DP, Hofer E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no Período de 1991 a 2008. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2010; 1(1): 93-100.

Lubelchek RJ, Weinstein RA. Antibiotic resistance and nosocomial infections. In: *The social ecology of infectious diseases*, Academic Press; 2008, p.241-274.

Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas; 2008.

Magalhães VD, Ferreira, JC, Barrelli, C, Darini, ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(2): 155-161.

Marano N, Arguin PM, Pappaioanou M. Impact of globalization and animal trade on infectious disease ecology. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(12): 1807-1809.

Marcondes SA. Brasil, amor à primeira vista! São Paulo: Peirópolis; 2005.

Marini MA, Garcia FI. Conservação de aves no Brasil. Megadiversidade. 2005; 1(1): 95-102.

Matias CAR, Oliveira VM, Rodrigues DP, Siciliano S. Summary of the birds species seized in the illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil. TRAFFIC Bulletin. 2012; 24(2): 83-86.

Mittermeier RA, Fonseca GAB, Rylands AB, Brandon K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. Megadiversidade. 2005; 1(1): 14-21.

Mörner T, Obendorf DL, Artois M, Woodford MH. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2002; 21(1): 67-76.

Munson L, Karesh WB. Disease monitoring for the conservation of terrestrial animals. In: Aguirre AA, editor. Conservation Medicine – Ecological health in practice. Oxford: University Press; 2002. p. 95-103.

Nascimento AMA, Cursino L, Gonçalves-Dornelas H, Reis A, Chartone-Souza E, Marini MA. Antibiotic-resistant Gram-negative bacteria in birds from the Brazilian Atlantic Forest. The Condor. 2003; 105(2): 358-361.

Okeke IN, Edelman R. Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. Clin Infect Dis. 2001; 33: 364-369.

Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of  $\beta$ -Lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist.* 2004; 10(4): 334-340.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin modifying enzyme. *Antimicrob Agents Ch.* 2006; 50(11): 3953-3955.

Pavlin BI, Schloegel LM, Daszak P. Risk of important zoonotic diseases through wildlife trade, United States. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(11): 1721-1726.

Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Siciliano S, Moreno IMB, Ott PH, et al. *Plesiomonas shigelloides* and Aeromonadaceae family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern brazilian coast. *Braz J Microbiol.* 2008; 39: 749-755.

Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(1): 56-59.

Pereira GA, Brito MT. Diversidade de aves silvestres brasileiras comercializadas nas feiras livres da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco. *Atualidades Ornitológicas.* 2005; 126:14.

Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6)-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemoth.* 2008; 61: 999–1002.

Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio. 2012; 3.

Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschäpe H, Adams LG, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. Infect Immun. 2002; 70(5): 2249-2255.

Redford KH. The empty Forest. BioScience. 1992; 42(6): 412-422.

Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and enteropathogens. Clinical Medicine & Research. 2003; 1(1): 5 – 12.

Refsum T, Vikoren T, Handeland K, Kapperud G, Holstad G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella typhimurium* infection in passerine birds in Norway. J Wildlife Dis. 2003; 39(1): 64-72.

Regueira RFS, Bernard E. Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. Biol Conserv. 2012; 149: 16-22.

RENTAS. 1º Relatório nacional sobre o tráfico da fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional Contra o Tráfico de Animais Silvestres; 2001. 108 p.

Ribeiro LB, Silva MG. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. Ciência e Cultura. 2007; 59(4): 4-5.

Rosen ER, Smith KF. Summarizing the evidence on the international trade in illegal wildlife. *EcoHealth*. 2010; 7: 24-32.

Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal Samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microb*. 2005; 71(3): 1394–1404.

Schwarz LM. *As barbas do imperador – D. Pedro II, um monarca nos trópicos*. São Paulo: Companhia das Letras; 1998.

Sick H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1997.

Sigrist T. *Aves do Brasil: uma visão artística*. São Paulo: Avis Brasilis; 2006.

Smith AL. Enteric Bacilli and Vibrios. In: Smith AL, editor. *Principles of Microbiology*. St. Louis: Mosby College Publishing; 1984. p. 527-553.

Steele CM, Brown RN, Botzler RG. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the pacific coast of California and Washington, USA. *J Wildlife Dis*. 2005; 41(4): 235-244.

Stepán J, Pantůček R, Doskar J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004; 49, 353-86.

Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Bacilos entéricos gram negativos. In: Strohl WA, Rouse H, Fisher BD, editors. *Microbiologia ilustrada*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 189-204.

Teuber M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56, 755-763.

Tizard I. Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 2004; 13(2): 50-66.

Thornley CN, Simmons GC, Callaghan ML, Nicol CM, Baker MG, Gilmore KS, et al. First incursion of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT160 into New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(4): 493-495.

Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. *J Infection.* 2008; 56: 83-98.

Tsubokura M, Matsumoto A, Otsuki K, Animas SB, Sanekata T. Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from migratory waterfowl. *J Wildl Dis.* 1995; 31(3): 352-357.

Werckenthin C, Cardoso M, Martel J, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res.* 2001; 32, 341–362.

Woodford MH. Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release in to the wild. Paris: OIE; 2001.

Anexo 1: Aves silvestres que tiveram material biológico coletado durante o período de estudo.

Família	Espécie	Total (n=109)
Emberezidae	Canário-da-terra ( <i>Sicalis flaveola</i> )	15
	Tiziu ( <i>Volatinia jacarina</i> )	11
	Papa-capim ( <i>Sporophila caerulescens</i> )	11
	Coleiro ( <i>Sporophila</i> sp.)	8
	Tico-tico ( <i>Zonotrichia capensis</i> )	5
	Pichochó ( <i>Sporophila frontalis</i> )	3
	Cigarra-verdadeira ( <i>Sporophila falcirostris</i> )	3
	Curió ( <i>Sporophila angolensis</i> )	2
	Bigodinho ( <i>Sporophila lineola</i> )	1
	Galinho-da-serra ( <i>Coryphospingus pileatus</i> )	1
Thraupidae	Sanhaço-cinzento ( <i>Tangara sayaca</i> )	5
	Sanhaço-de-encontro-amarelo ( <i>Tangara ornata</i> )	4
	Tiê-sangue ( <i>Ramphocelus bresilius</i> )	3
	Galo-da-campina ( <i>Paroaria dominicana</i> )	3
	Tiê-preto ( <i>Tachyphonus coronatus</i> )	1
Cardinalidae	Trinca-ferro ( <i>Saltator similis</i> )	6

	Tempera-viola ( <i>Saltator maximus</i> )	1
	Azulão ( <i>Cyanoloxia brissonii</i> )	1
Icteridae	Garibaldi ( <i>Chrysomus ruficapillus</i> )	8
	Melro ( <i>Gnorimopsar chopi</i> )	3
	Maria-preta ( <i>Molothrus bonariensis</i> )	1
Turdidae	Sabiá-laranjeira ( <i>Turdus rufiventris</i> )	4
	Sabiá-coleira ( <i>Turdus albicollis</i> )	1
	Sabiá-poca ( <i>Turdus amaurochalinus</i> )	1
Psittacidae	Tiriba-de-testa-vermelha ( <i>Pyrrhura frontalis</i> )	1
	Periquitão-maracanã ( <i>Aratinga leucophthalma</i> )	1
	Papagaio-verdadeiro ( <i>Amazona aestiva</i> )	1
Fringillidae	Fin-fim ( <i>Euphonia chlorotica</i> )	2
Estrildidae	Bico-de-lacre ( <i>Estrilda astril</i> )	1
Tyrannidae	Bentevi ( <i>Pitangus sulphuratus</i> )	1

---

Anexo 2: Ficha de controle individual contendo dados do espécime em questão.



**Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente**

Nº Amostra \_\_\_\_\_ Nº IOC \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2011

Local \_\_\_\_\_ Quantidade de animais \_\_\_\_\_

Dados meteorológicos \_\_\_\_\_

**Animal apreendido**

Numero de animais da espécie \_\_\_\_\_ Família \_\_\_\_\_

Nome comum \_\_\_\_\_ Nome Científico \_\_\_\_\_

Tempo entre apreensão e coleta \_\_\_\_\_ Tempo entre coleta e processamento \_\_\_\_\_

Acondicionamento \_\_\_\_\_

Idade ( ) Filhote ( ) Jovem ( ) Adulto

**Status**

Brasil ( ) Rio de Janeiro ( ) IUCN ( ) Não ameaçado ( )

Autóctone ( ) Alóctone ( ) RE ( ) VS ( ) VN ( ) VO ( ) VA ( )

RE = residente (evidências de reprodução no país disponíveis);  
 VS = visitante sazonal oriundo do sul do continente;  
 VN = visitante sazonal oriundo do hemisfério norte;  
 VO = visitante sazonal oriundo de áreas a oeste do território brasileiro;  
 VA = vagante (espécie de ocorrência aparentemente irregular no Brasil; pode ser um migrante regular em países vizinhos, oriundo do sul [VA (S)], do norte [VA (N)] ou de oeste [VA (O)], ou irregular num nível mais amplo [V A]).

**Habitat**

FA ( ) FM ( ) FG ( ) FC ( ) MA ( ) FS ( ) R ( ) M ( ) C ( )

H<sub>2</sub>O ( ) B ( ) CAA ( ) CE ( ) P ( ) AA ( )

FA = Floresta ou Mata Atlântica  
 FG = Mata ou Floresta de Galeria  
 MA = Mata de Araucária  
 R = Restinga  
 C = Campos  
 B = Buritizais  
 CE = Cerrado  
 AA = Áreas antropicas

FM = Floresta Mesofica  
 FC = Mata ou Floresta Ciliar  
 FS = Mata ou Floresta Subtropical  
 M = Manguezais  
 H<sub>2</sub>O = Ambiente Aquático  
 CAA = Caatinga  
 P = Pantanal

**Alimentação**

ON ( ) CAR ( ) PI ( ) NEC ( ) IN ( ) MAL ( ) FR ( ) FI ( ) NE ( )

GR ( )

ON = Onívoro  
 IN = Insetívoro  
 NET = Nectarívoro  
 CAR = Carnívoro  
 MAL = Malacófago  
 GR = Granívoro  
 PI = Piscívoro  
 FR = Frugívoro  
 NEC = Necrófago  
 FI = Fitófago

**Avaliação clínica**

Presença de ectoparasitos Sim ( ) Não ( )      Diarréia Sim ( ) Não ( )

**Exame físico**

**Observações adicionais**

## Anexo 3: Autorização do ICMBio para coleta de amostras de animais da fauna silvestre nativa com a finalidade de pesquisa científica.



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26383-2</b>	<b>Data da Emissão: 18/09/2012 19:04</b>	<b>Data para Revalidação*: 13/10/2013</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Carlos Alexandre Rey Matias	CPF: 070.531.817-66
Título do Projeto: Isolamento e caracterização de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae em animais da fauna silvestre nativa, provenientes do tráfico de animais, no Estado do Rio de Janeiro: riscos para a Saúde Pública	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras	01/2011	12/2012
2	Análise das amostras	01/2011	12/2012
3	Organização e análise dos dados	07/2011	12/2012
4	Produções científicas	07/2011	12/2013

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Exportação).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Outras ressalvas

1	O planejamento e execução das atividades de contenção (física e química) e de coleta de material biológico em cativeiro são de responsabilidade da equipe técnica do mantenedor e devem ser acordadas previamente com os executores do projeto.
---	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Salvatore Siciliano	Coordenador do projeto	778.497.797-20	04861/87 CRB-RJ	Brasileira

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

**Código de autenticação: 73557498**



Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26383-2</b>	<b>Data da Emissão: 18/09/2012 19:04</b>	<b>Data para Revalidação*: 18/10/2013</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Carlos Alexandre Rey Matias	CPF: 070.531.817-66
Título do Projeto: Isolamento e caracterização de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae em animais da fauna silvestre nativa, provenientes do tráfico de animais, no Estado do Rio de Janeiro: riscos para a Saúde Pública	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SEROPEDICA	RJ	Centro de Triagem de Animais Silvestres - RJ	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aves, Testudinidae, Crocodylia, Didelphimorphia, Perissodactyla, Primates, Rodentia, Squamata, Xenarthra, Canidae, Carettochelyidae, Chelidae, Chelydridae, Dermatemnydidae, Emydidae, Felidae, Geoemydidae, Kinosternidae, Mustelidae, Podocnemididae, Procyonidae, Artiodactyla

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Fezes
4	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão
5	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Material utilizado em análise microbiológica e histopatológica.

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

**Código de autenticação: 73557498**



Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26383-2</b>	<b>Data da Emissão: 18/09/2012 19:04</b>	<b>Data para Revalidação*: 18/10/2013</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Carlos Alexandre Rey Matias	CPF: 070.531.817-66
Título do Projeto: Isolamento e caracterização de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae em animais da fauna silvestre nativa, provenientes do tráfico de animais, no Estado do Rio de Janeiro: riscos para a Saúde Pública	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

**Código de autenticação: 73557498**



Página 3/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 26383-2</b>	<b>Data da Emissão: 18/09/2012 19:04</b>	<b>Data para Revalidação*: 18/10/2013</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Carlos Alexandre Rey Matias	CPF: 070.531.817-66
Título do Projeto: Isolamento e caracterização de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Aeromonadaceae em animais da fauna silvestre nativa, provenientes do tráfico de animais, no Estado do Rio de Janeiro: riscos para a Saúde Pública	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

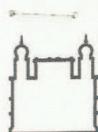
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet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

**Código de autenticação: 73557498**



Página 4/4

Anexo 4: Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-1/13

Certificamos que o protocolo (P-5/12-5), intitulado "Isolamento e caracterização de enteropatógenos bacterinanos em aves provenientes do tráfico de animais selvagens no Estado do Rio de Janeiro – Brasil: riscos para a Saúde Pública", sob a responsabilidade de DALIA DOS PRAZERES RODRIGUES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 10/12/2016 e inclui o uso total de :

*Amazona aestiva*  
- 1 Machos.

*Amazona amazonica*  
- 1 Machos.

*Sicalis flaveola*  
- 15 Machos.

*Aratinga leucophthalma*  
- 1 Machos.

*Volatinia jacarina*  
- 11 Machos.

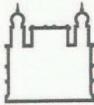
*Chrysomus ruficapillus*  
- 8 Machos.

*Coryphospingus pileatus*  
- 1 Machos.

( Continua )

  
Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

LW-1/13

( Continuação da Licença Nº LW-1/13, Protocolo Nº P-5/12-5 )

*Cyanocompsa brissonii*  
- 1 Machos.

*Estrilda astrild*  
- 1 Machos.

*Euphonia chlorotica*  
- 3 Machos.

*Gnorimopsar chopi*  
- 3 Machos.

*Sporophila caerulea*  
- 11 Machos.

*Molothrus bonariensis*  
- 1 Machos.

*Sporophila sp*  
- 8 Machos.

*Paroaria dominicana*  
- 3 Machos.

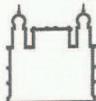
*Pitangus sulphuratus*  
- 1 Machos.

*Pyrrhura frontalis*  
- 1 Machos.

( Continua )

  
Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

LW-1/13

( Continuação da Licença Nº LW-1/13, Protocolo Nº P-5/12-5 )

*Zonotrichia capensis*  
- 5 Machos.

*Tangara sayaca*  
- 5 Machos.

*Saltator maximus*  
- 1 Machos.

*Saltator similis*  
- 6 Machos.

*Tangara ornata*  
- 4 Machos.

*Turdus rufiventris*  
- 4 Machos.

*Sporophila frontalis*  
- 5 Machos.

*Sporophila falcirostris*  
- 3 Machos.

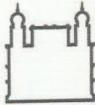
*Ramphocelus bresilius*  
- 3 Machos.

*Sporophila angolensis*  
- 2 Machos.

( Continua )

  
Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-1/13

( Continuação da Licença Nº LW-1/13, Protocolo Nº P-5/12-5 )

*Sporophila lineola*  
- 1 Machos.

*Turdus albicollis*  
- 1 Machos.

*Turdus amaurochalinus*  
- 1 Machos.

*Tachyphonus coronatus*  
- 1 Machos.

*Aratinga aurea*  
- 1 Machos.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2012

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br