

Análise Microbiológica em Aves Silvestres: Patógenos Virais e Bacterianos

Carlos E. R. de Sant'Ana, Talita S. Ramos, Wilia M. E. D. Brito, Georgia R. S. de Sant'Ana, Luiz A. M. L. Baptista, Luana N. C. Alves & Elaine M. Silva

Foram analisadas amostras de soro e “swabs” cloacais de 88 aves pertencentes a 13 diferentes espécies albergadas no CETAS de Goiânia-GO para a identificação de patógenos virais (influenza e Newcastle) e bacterianos (*Salmonella* sp e *Escherichia coli*). Os resultados de soros não reagentes para os agentes virais indicam que os espécimes estudados ainda não haviam entrado em contato com os antígenos virais influenza e Newcastle e a identificação presuntiva de bactérias patogênicas indica a possibilidade de transmissão destes patógenos para humanos.

Palavras-chave: *zoonoses; patógenos humanos; doenças infecciosas.*

We analyzed serum samples and cloacal swabs of 88 birds of 13 different species present in CETAS-GO to identify viral (influenza and Newcastle) and bacterial (*Salmonella* sp and *Escherichia coli*) pathogens. The results of non-reactive sera for viral agents indicate that the specimens studied had not yet contacted with influenza viral and Newcastle antigens and the presumptive identification of pathogenic bacteria confirms the possibility of transmission of these pathogens to humans.

Keywords: *zoonotic diseases; human pathogens; infectious diseases.*

Introdução

Diversas pandemias, como as de cólera, gripe e outras doenças, causam sérios impactos às populações humanas. Surtos claramente definidos de doenças panzooticas em animais selvagens são provavelmente raros, mas a falta de conscientização e informação, ocorrida durante décadas, certamente escondem a verdadeira extensão desses eventos¹. Historicamente, as doenças dos animais selvagens foram consideradas importantes apenas quando a agricultura ou saúde humana estavam sendo consideradas ameaçadas. No entanto, a ocorrência de surtos de doenças em espécies ameaçadas^{1,2}, aumento do envolvimento veterinário^{3,4} e os avanços da biologia populacional hospedeiro-parasita^{5,6} têm feito as ameaça de doenças dos animais selvagens serem levadas mais a sério.

O número crescente de animais selvagens com doenças infecciosas emergentes pode refletir um aumento cada vez maior da vigilância, mas paralelos entre os fatores causais de condução de doenças humanas emergentes e doenças na vida selvagem sugerem que esta tendência é válida^{1,7}. A expansão da população humana tem impulsionado o surgimento de doenças infecciosas emergentes via aumento da densidade populacional, especialmente em áreas urbanas (dengue, cólera), e ambientes aquáticos devido à contaminação dos mananciais^{8,9}.

Cada vez mais os humanos estão em exposição a patógenos zoonóticos, ou seja, os que foram transmitidos naturalmente entre os animais e os seres humanos, com ou sem a criação de um novo ciclo de vida em humanos. Os animais selvagens desempenham um papel chave na sua emergência, fornecendo um “pool zoonótico” a partir dos quais agentes patogênicos anteriormente desconhecidos podem emergir^{1,2}. Isso ocorre classicamente para o vírus influenza, que causa a pandemia em humanos após a troca periódica de genes entre os vírus de aves selvagens e domésticas, porcos e seres humanos.

As aves silvestres, por sua vez, submetidas a elevado nível de estresse durante o tráfico¹⁰ (terceiro maior comércio ilegal mundial) e a sua recuperação, podem estar sujeitas a contaminação e a colonização por diversos tipos de patógenos¹¹, dentre outros motivos, devido ao processo de imunossupressão.

A detecção precoce e precisa desses patógenos gera uma melhor compreensão das causas do surgimento da doença e dos agentes e seus hospedeiros, o que ajudará na prevenção do surgimento e controle de futuros surtos zoonóticos^{12,13}. Embora alguns desses microrganismos constituam componentes normais da microbiota intestinal dos animais, as aves silvestres podem funcionar como reservatórios para esses agentes, alguns dos quais invasivos e virulentos ao homem^{14,15}.

Os animais silvestres, apreendidos ou resgatados pelos órgãos fiscalizadores, são encaminhados à quarentena do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA), a fim de serem submetidos a exames específicos para a identificação de doenças (particularmente zoonoses). Após os resultados dos exames e testes laboratoriais, necessários à avaliação das condições biológicas dos animais, são definidos os destinos das aves (soltura, por exemplo) que estarão vinculados ao contato direto ou indireto com humanos¹⁶.

No presente estudo foram avaliadas as condições sanitárias de 88 aves de 13 diferentes espécies, albergadas no CETAS de Goiânia-GO, para a identificação de patógenos virais (influenza e Newcastle) e bacterianos (*Salmonella* sp e *Escherichia coli*) presentes em amostras biológicas desses animais.

Metodologia

A partir de 88 aves, de 13 espécies diferentes presentes no CETAS de Goiânia, no 1º semestre de 2010, foram obtidas amostras de sangue (soro) e excreção cloacal (“swab”). As aves foram divididas em três grupos (Tabela 1) de acordo com a respectiva Ordem (classificação taxonômica) das espécies: a Ordem Psittaciformes, com 6 espécies e totalizando 52 indivíduos (araras, papagaios, maritacas e periquitos); a Ordem Piciformes, com uma única espécie representante e totalizando 11 indivíduos (tucanos) e a Ordem Passeriformes, não subdividida em estratos, representada por 6 espécies e totalizando 25 espécimes (pássaros-pretos, sabiás e canários-da-terra, dentre outros).

As amostras de sangue, para a pesquisa de anticorpos para os vírus influenza e Newcastle, foram coletadas através de venopunção nas asas, nas patas e na jugular

e foram mantidas em repouso em temperatura ambiente por, no mínimo, 30 minutos para a obtenção de soro e em seguida estocadas a uma temperatura de 4°C.

Tabela 1. Distribuição de espécimes de aves silvestres, a partir das quais foram coletados os materiais biológicos no CETAS de Goiânia-GO, em suas respectivas espécies e ordens.

NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	NÚMERO DE AVES
ORDEM PSITTACIFORMES		
<i>Amazona aestiva</i> (Linnaeus, 1758)	papagaio-verdadeiro	10
<i>Amazona amazonica</i> (Linnaeus, 1766)	Papagaio-do-mangue ou curica	2
<i>Ara ararauna</i> (Linnaeus, 1758)	arara-canindé	20
<i>Aratinga aurea</i> (Gmelin, 1788)	periquito-coco ou periquito-rei	1
<i>Aratinga leucophthalma</i> (Statius Muller, 1776)	maritaca ou periquitão-maracanã	10
<i>Brotogeris chiriri</i> (Vieillot, 1818)	periquito-de-encontro-amarelo	9
ORDEM PICIFORMES		
<i>Ramphastos toco</i> (Statius Muller, 1776)	tucanuçu	11
ORDEM PASSERIFORMES		
<i>Chrysomus ruficapillus</i> (Vieillot, 1819)	garibaldi	1
<i>Gnorimopsar chopi</i> (Vieillot, 1819)	pássaro-preto ou graúna	8
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	canário-da-terra-verdadeiro	12
<i>Sporophila collaris</i> (Boddaert, 1783)	coleiro-do-brejo	1
<i>Sporophila nigricollis</i> (Vieillot, 1823)	papa-capim ou baiano	1
<i>Turdus amaurochalinus</i> (Cabanis, 1850)	sabiá-poca	2
TOTAL		88

As amostras de excreção cloacal, para o isolamento e identificação de bactérias (*Salmonella* sp e *Escherichia coli*) foram coletadas através de “swabs” que, imediatamente após a coleta, foram imersos em um tubo com 10 mL de solução salina a 0,9% e acondicionados sob refrigeração. O fluxograma das etapas e procedimentos realizados para a identificação de agentes infecciosos com potencial zoonótico nas amostras de soro e excreção cloacal coletadas é apresentado na Figura 1.

A pesquisa de anticorpos foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático indireto para vírus influenza de diferentes cepas, independentemente de sua classificação HN (CIVTEST® AVI INFLUENZA, Laboratórios HIPRA S. A, Espanha), e para vírus da doença de Newcastle – NDV, Paramixovirus do tipo 1 – PMV1 (CIVTEST® AVI

NDV, Laboratórios HIPRA S. A, Espanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

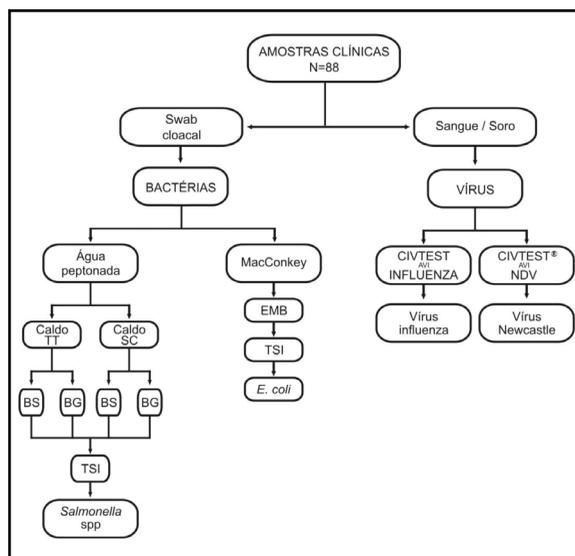


Figura 1. Fluxograma das etapas realizadas para a identificação de agentes infecciosos (vírus e bactérias) com potencial zoonótico em amostras de soro e excreção cloacal de 88 aves de diferentes espécies presentes no CETAS de Goiânia-GO.

Inicialmente foi realizado o pré-enriquecimento, adicionando-se 1 mL da suspensão cloacal de cada ave coletada em 9 mL de água peptonada tamponada a 0,1%, a qual foi posteriormente incubada a 35°C por no mínimo 18h. Após homogeneização, inoculou-se 1 mL desta solução em um tubo contendo 10 mL de caldo Tetrionato - TT (Acumedia Manufacturers, Michigan) e 1 mL em um outro tubo com 10 mL do caldo Selenito Cistina - SC (Acumedia Manufacturers, Michigan), ambos incubados a 35°C por 24h, para o enriquecimento seletivo¹⁷.

Em seguida, após a agitação, uma alçada de cada meio de enriquecimento seletivo foi estriada por esgotamento em placas de Petri contendo o ágar Verde Brilhante - BG (Neogen Corporation, Michigan) e o ágar Bismuto Sulfito – BS (Acumedia Manufacturers, Michigan). As placas foram incubadas a 35°C por 24h. As colônias sugestivas de *Salmonella* foram inoculadas em tubos contendo o ágar *Triple Sugar Iron* (*Triplíce Açúcar Ferro* – TSI) (MERCK, Germany), que foi incubado a 35°C por 24h, para uma identificação presuntiva de *Salmonella*¹⁷.

Para a detecção presuntiva de *E. coli*, 1 mL da suspensão de excreção cloacal de cada ave foi inoculado em placas contendo o ágar MacConkey (Difco, USA) e incubado a 42°C por 24h. Para a identificação preliminar, as colônias típicas de *E. coli* foram inoculadas em placas de Petri com o ágar Eosina Azul de Metileno - EMB (MERCK, Germany) e incubadas por 24h a 35°C. As colônias típicas foram inoculadas em tubos com ágar *Triplíce Açúcar Ferro*, os quais foram incubados por 24h a 35°C, para uma identificação presuntiva do gênero.

Os resultados analíticos foram avaliados quanto à variância (ANOVA) e, posteriormente, realizado o teste de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Nenhuma das 88 amostras de soro analisadas foi reagente para os vírus influenza e Newcastle. Com base nestes resultados negativos, os respectivos dados foram excluídos das análises, pois em nenhum dos casos eles influenciariam os resultados ou apresentaram algum nível de significância estatística.

A pesquisa de anticorpos foi direcionada para dois sorotipos circulantes na espécie humana, H1N1 e H3N2 e a ausência desses anticorpos, por sua vez, indica que, provavelmente, nenhuma das aves analisadas teve contato com os agentes virais pesquisados. Alguns casos de aves silvestres sorologicamente positivas para estes vírus já foram identificados em trabalhos realizados por outros pesquisadores^{18,19}, também havendo estudos que não identificaram a presença de RNA viral em amostras de aves silvestres, capturadas próximas a granjas avícolas no Estado de São Paulo²⁰.

Em relação ao NDV (Newcastle), as pesquisas sobre a enfermidade são frequentemente realizadas em aves domésticas reprodutoras, de corte, poedeiras comerciais²¹ e poucos são os estudos realizados em aves silvestres. Diferentemente do presente trabalho, outros estudos identificaram anticorpos em soro de pardais (*Passer domesticus*) em Pernambuco²² e observaram soros reagentes para NDV em aves silvestres no Rio de Janeiro²³ (mesmo com uma baixa frequência de 0,95%). Como as aves silvestres servem como reservatórios para a manutenção dos vírus no ambiente²⁴, reforça-se a necessidade de investigações

sobre a sua importância na epidemiologia dessa enfermidade, uma vez que a identificação de aves domésticas e/ou silvestres positivas torna factível a recrudescência e a propagação para humanos²⁵.

A detecção presuntiva dos agentes infecciosos bacterianos foi apresentada por grupos (Tabela 2) e, particularmente, para os Psittaciformes (Tabela 3). Entre as 88 aves analisadas, 30 (34%) foram positivas para bactérias.

Os dados encontrados neste estudo referentes à ocorrência de microrganismos oscilaram muito entre as ordens. O maior índice de microrganismos encontrados foi no grupo dos Psittaciformes (Figura 2), com destaque para as araras (que apresentaram a maior incidência, dentre os estratos) e com predominância de agentes bacterianos, principalmente *E. coli*. Nos outros estratos (papagaios, maritacas e periquitos) a ocorrência dos agentes microbianos foi baixa, com exceção da *E. coli* (75% nos papagaios e 90% maritacas). Os Passeriformes apresentaram percentagens baixas de bactérias e os Piciformes possuíram quantidades intermediárias de bactérias em relação aos outros grupos, apresentando maior quantidade de *E. coli*. *Salmonella* sp foi detectada apenas nas araras (Psittaciformes).

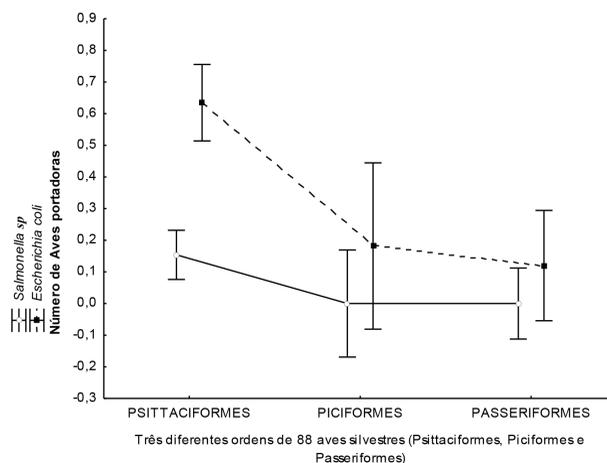


Figura 2. Agentes infecciosos, bactérias em amostras de excreção cloacal de 88 aves silvestres distribuídas em três diferentes Ordens (Piciformes, Passeriformes e Psittaciformes) presentes no CETAS de Goiânia-GO.

Dentre as doenças aviárias que acometem seres humanos, as causadas por *Salmonella* sp e *E. coli* merecem destaque para a Saúde Pública²⁶. Das 52 amostras de

Tabela 2. Agentes infecciosos em amostras de excreção cloacal de 88 aves silvestres distribuídas em três diferentes Ordens (Piciformes, Passeriformes e Psittaciformes) presentes no CETAS de Goiânia-GO (n representa o número de indivíduos infectados).

AGENTES INFECCIOSOS	AVES			
	PICIFORMES (11 espécimes) n (%)	PASSERIFORMES (25 espécimes) n (%)	PSITTACIFORMES (52 espécimes) n (%)	TOTAL (88 espécimes) n (%)
<i>Salmonella sp</i>	-	-	8 (15,4)	8 (9,1)
<i>Escherichia coli</i>	2 (18,2)	3 (12,0)	33 (63,5)	38 (43,1)

Tabela 3. Agentes infecciosos em amostras de excreção cloacal de 52 aves da ordem Psittaciformes presentes no CETAS de Goiânia-GO (n representa o número de indivíduos infectados).

AGENTES INFECCIOSOS	PSITTACIFORMES			
	ARARAS (20 espécimes) n (%)	PAPAGAIOS (12 espécimes) n (%)	MARITACAS (10 espécimes) n (%)	PERIQUITOS (10 espécimes) n (%)
<i>Salmonella sp</i>	8 (40,0)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	11 (55,0)	9 (75,0)	9 (90,0)	4 (40,0)

“swabs” cloacais analisadas para os Psittaciformes, as de *Ara ararauna* (araras) obtiveram um total de 40% positivas preliminarmente para *Salmonella sp*. Esse resultado deve ser analisado com cautela, pois algumas espécies apresentam este agente naturalmente em sua microbiota e podem ser portadoras assintomáticas, não desenvolvendo manifestações clínicas. Por outro lado, o contato com essas aves portadoras pode desencadear a transmissão dos agentes bacterianos, favorecendo a ocorrência de enfermidade em humanos²⁷. Alguns estudos já detectaram a presença de DNA bacteriano de *Salmonella sp* em amostras de “swabs” cloacais pela técnica de PCR²⁸, embora resultados negativos, diferentes do presente estudo, também já tenham sido obtidos por outros autores²⁹.

Em relação à ocorrência de *Escherichia coli* em aves silvestres no Brasil, detectou-se a presença deste agente em 80% das amostras de “swabs” cloacais de *Fregata magnificens*, ave marinha da ordem Pelecaniformes, na costa do Estado de São Paulo³⁰. Estes resultados foram superiores aos valores encontrados no presente trabalho, que analisou gêneros de aves diferentes e obteve os valores de 18,2%, 12,0% e 63,5% para Piciformes, Passeriformes e Psittaciformes, respectivamente.

De modo geral, os Psittaciformes apresentaram os índices mais elevados para *Salmonella sp* e *Escherichia*

coli pesquisados. Entre os estratos desta ordem, as araras e os papagaios obtiveram as percentagens mais significativas, possivelmente por ambas serem espécies mais procuradas e apreendidas no tráfico de animais silvestres no Estado de Goiás, o que gera um comprometimento e alteração na imunidade da ave, um provável aumento da vulnerabilidade destes animais em relação aos agentes infecciosos, uma maior aquisição, manutenção e transmissão destes microrganismos ao homem.

Conclusões

A ausência de anticorpos para os dois agentes virais pesquisados constituem dados importantes para a Saúde Pública e também para a Sanidade Avícola, pois indicam que provavelmente uma parcela das aves silvestres circulantes no município de Goiânia e outros estados, ainda não entraram em contato com os antígenos virais do vírus influenza e Newcastle, não sendo portadoras destes patógenos. Como as aves analisadas são apenas uma pequena parcela, ressalta-se a importância de novas pesquisas com outros grupos aviários.

A ordem Piciformes necessita de pesquisas vinculadas aos agentes potencialmente zoonóticos, pois existem poucos estudos com este grupo nesta área e eles

despertam um grande interesse no tráfico de animais silvestres, em decorrência da sua beleza de cores.

Em relação à zoonoses transmitidas por aves silvestres em Goiás, os resultados obtidos neste trabalho poderão servir como subsídios para o estabelecimento de medidas preventivas e ressaltam a necessidade de novas investigações nesta área, para que o controle de doenças infecciosas no município de Goiânia e no Estado de Goiás possa ser implementado.

Referências

1. Daszak, P.; Cunningham, A. A.; Hyatt, A. D. E. *Science* **2000**, 287.
2. Thorne, T.; Williams, E. S. *Conserv. Biol.* **1988**, 2.
3. (a) Viggers, K. L.; Lindenmayer, D. B.; Spratt, D. M. *Wildl. Res.* 1993, 20, 687. (b) Woodford, M. H. *J. Zoo Wildl. Med.* 1993, 24, 265. (c) Cunningham, A. A. *Conserv. Biol.* **1996**, 10, 349.
4. Woodroffe, R. *Anim. Conserv.* **1999**, 2, 185.
5. Anderson, R. M.; May, R. M. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1986**, 314, 533.
6. (a) Anderson, R. M.; May, R. M. *Nature* 1979, 280, 361. (b) Hudson, P.; Greenman, J. *Trends Ecol. Evol.* 1998, 13, 387. (c) Tompkins, D. M.; Begon, M. *Parasitol. Today* **1999**, 15, 311.
7. (a) Fidler, D. P. *Emerg. Infect. Dis.* 1996, 2, 77. (b) McMichael, A. J. et al., *Bioscience* 1999, 49, 206. (c) Pimm, S. L. et al., *Science* **1995**, 269.
8. Morse, S. S. *Em Emerging Viruses*. Morse, S. S. Oxford University Press: New York, **1993**.
9. (a) Murray, K. et al. *Science* 1995, 268, 94. (b) Mackenzie, J. S. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, 5, 1.
10. Pagano, I. S. A.; Sousa, A. E. B. A.; Wagner, P. G. C.; Ramos, R. T. C. *Ornithologia* **2009**, 3, 132.
11. RENTAS. Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres, Brasília, **2001**.
12. Schloegel, L. M.; Daszak, P.; Naya, A. *Natureza & Conservação* **2005**, 3, 29.
13. Meslin, F. X. *Vet. Ital.* **2008**, 44, 583.
14. Kelly, T. R.; Hawkins, M. G.; Sandrock, C. E.; Boyce, W. M. *J. Avian Med. Surg.* **2008**, 22, 1.
15. Vasconcelos, S. A. *Biológico* **2001**, 63, 63.
16. IBAMA. Campanha Nacional de Proteção à Fauna Silvestre – Relatório Semestral. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em 06/11/2010.
17. Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. A. S. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. Varela: São Paulo, **2001**.
18. Oliveira Junior, G.; Belluci, M. S. P.; Vianna, J. S. M.; Mazur, C.; Andrade, C. M.; Fedullo, L. P. L.; Portz, C.; Loureiro, B. O. *Arq. Brasil. de Med. Vet. e Zoot.*, **2001**, 53, 299.
19. Olsen, B.; Munster, V. J.; Wallensten, A.; Waldenstroms, J.; Osterhaus, A. D. M. E.; Fouchier, R. A. M. *Science*, **2006**, 312, 2384.
20. Guimarães, M. B.; Bello, C. P.; Hurtado, R. F.; Ferreira, A. J. P. *Anais da Sem. Cient. Benjamin Eurico Malucelli*, **2001**, 106.
21. Franzo, V. S. *Ver. Ciênc. Vet.* **2007**, 5, 81.
22. Silva, J. S. A.; Mota, R. A.; Vilela, S. M.O.; Júnior, D.; Júnior, P.; Silva L. B. G. *Ver. Bras. Ciênc. Avic.* **2006**, 8, 125.
23. Oliveira Junior, J. G.; Portz, C.; Loureiro, B. O.; Schiavo, P. A.; Fedullo, L. P. L.; Mazur, C.; Andrade, C. M. *Ciênc. Rural* **2003**, 33, 381.
24. Paulillo, A. C.; Silva, G. S.; Doretto Junior, L.; Gama, N. M. S. Q.; Nishizawa, M.; Schocken-Iturrino, F. *Arq. Inst. Biol.* **2005**, 72, 313.
25. Seal, B. S.; King, D. J.; Locke, D. P.; Senne, D. A.; Jackwood, M. W. *J. Clin. Microb.* **1998**, 36, 1141.
26. Kabir, S. M. L. *Intern. J. Envir. Res. Pub. Health* **2010**, 7, 89.
27. Nunes, O. C. *Dissertação de Mestrado, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia*, **2007**.
28. Allgayer, M. C. *Acta Scient. Veter.* **2003**, 31, 141.
29. Brightsmith, D. J.; Butron, O. J. *Wildl. Dis.* **2010**, 46, 718.
30. Savioli, J. Y. *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo*, **2010**.

Carlos E. R. de Sant'Ana^{1*}, Talita S. Ramos², Wilia M. E. D. Brito², Georgia R. S. de Sant'Ana^{3,4}, Luiz A. M. L. Baptista⁵, Luana N. C. Alves³ & Elaine M. Silva³

¹Instituto de Estudos Socioambientais (IESA), Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Cx. Postal 131, 74001-970, Goiânia-GO, Brasil

²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás, Rua 235, s/n, St. Universitário, 74605050, Goiânia-GO, Brasil

³Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, 75113-630, Anápolis-GO, Brasil

⁴Jardim Botânico de Goiânia (AMMA), 74820-030, Goiânia-GO, Brasil

⁵Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA), Rua 229, nº 95, St. Universitário, 74605-090, Goiânia-GO, Brasil

*e-mail: kadu@iesa.ufg.br