



Bactérias zoonóticas isoladas de Passeriformes silvestres recuperados do tráfico de animais no estado do Ceará/Brasil

[Zoonotic bacteria isolated from wild Passeriformes recovered from animal trafficking in the State of Ceará/Brazil]

F.C. Gaió¹, E.S. Lopes¹, B.P. Lima¹, C.C. Carmo¹, A.R. Marques¹, F.R. Oliveira¹,
M.S.M.G. Amaral², N.M. Pascoal Filho¹, A.S. Carreira¹, A.J.F. Beleza¹,
R.S.C. Teixeira¹, A. Havt², W.C. Maciel^{1*}

¹Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza, CE

²Universidade Federal do Ceará - Fortaleza, CE

Marques
<https://orcid.org/0000-0003-4472-2999>
Carreira
<https://orcid.org/0000-0002-3215-4560>
Lima
<https://orcid.org/0000-0001-6805-0344>
Carmo
<https://orcid.org/0000-0001-7462-1887>
Maciel
<https://orcid.org/0000-0002-6093-7933>
Oliveira
<https://orcid.org/0000-0002-2584-6593>
Gaió
<https://orcid.org/0000-0002-9569-3983>
Beleza
<https://orcid.org/0000-0001-9406-9583>
Pascoal Filho
<https://orcid.org/0000-0003-3064-4352>
Lopes
<https://orcid.org/0000-0002-0533-8751>
Amaral
<https://orcid.org/0000-0002-7005-7841>
Teixeira –
<https://orcid.org/0000-0002-8348-7218>

RESUMO

A ordem dos Passeriformes é uma das mais pressionadas pelas ações antrópicas, especialmente as relativas ao tráfico de animais, que, devido às más condições de manejo e higiênico-sanitárias, favorecem a infecção dos espécimes por patógenos virulentos e zoonóticos, como cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., cujo isolamento em suabes cloacais, bem como a análise dos genes de virulência das cepas de *E. coli* foram objetivos do estudo. Para isso, 120 Passeriformes silvestres nativos, recebidos pelo Cetac/CE, foram avaliados individualmente. As cepas isoladas foram submetidas a teste de disco difusão para determinação da sensibilidade aos antimicrobianos. Em etapa posterior, foi realizada PCR para a detecção de oito genes de virulência dos principais patótipos diarréogênicos de *E. coli*. Quanto aos resultados, nenhuma cepa de *Salmonella* spp. foi isolada, no entanto a ocorrência de *E. coli* foi de 40,8%. Foi observada elevada resistência, principalmente aos antimicrobianos tetraciclina, ampicilina e sulfazotrim, ocorrendo multirresistência em 42,8% das cepas. Pela análise molecular, foram diagnosticados quatro entre os nove genes pesquisados, com a identificação de EPEC típicas, EPEC atípicas, ETEC, EHEC e EAEC. Os resultados apontam para a importância de Passeriformes como possíveis disseminadores de zoonoses.

Palavras-chave: Passeriformes silvestres, tráfico de animais, zoonoses, *Escherichia coli*, saúde pública

ABSTRACT

The order Passeriformes is one of the most pressured by anthropic actions, especially those related to animal trafficking. Due to poor sanitary and hygienic conditions, the infection of the specimens is favored by virulent and zoonotic pathogens such as strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., whose isolation in cloacal swabs as well as the analysis of the virulence genes of *E. coli* strains were the objectives of the study. For this, 120 native wild Passeriformes, received by CETAS/CE were individually evaluated. The isolated strains were submitted to diffusion disc test to determine sensitivity to antimicrobials. In a later stage, PCR was performed for the detection of eight virulence genes from the main *E. coli* diarrhoeagenic pathogens. Regarding the results, no strain of *Salmonella* spp. was isolated; however, the occurrence of *E. coli* was 40.8%. High resistance was observed, mainly to the antimicrobials Tetracycline, Ampicillin and Sulfazotrim, with multi-resistance in 42.8% of the strains. By molecular analysis, four of the nine genes were diagnosed, identifying typical EPEC, atypical EPEC, ETEC, EHEC and EAEC. The results point to the importance of Passeriformes as possible disseminators of zoonoses.

Keywords: wild passeriformes, animal trafficking, zoonosis, *Escherichia coli*, public health

Recebido em 13 de junho de 2017

Aceito em 25 de janeiro de 2019

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: william.maciel@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A caça e o comércio de animais silvestres oriundos de seu *habitat* natural são atividades proibidas no Brasil, cerceada por órgãos do governo nos níveis municipal, estadual e federal (Oliveira *et al.*, 2018), entretanto essa contravenção ainda retira cerca de 38 milhões de animais do ambiente nativo (Mendes, 2018). Além disso, o impacto dessa atividade resulta em um índice de mortalidade que pode alcançar 90% dos animais em razão das más condições de captura e transporte (Pagano *et al.*, 2009).

Quando os espécimes explorados ilegalmente retornam ao poder do Estado, por meio de apreensões ou por entregas voluntárias, são direcionados aos Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas), Centros de Reabilitação de Animais Silvestres (Cras) ou empreendimentos afins (Guidelines..., 2002; Matias *et al.*, 2012). A classe de animais mais recebida nesses centros é a das aves, sendo a ordem dos Passeriformes a mais abundante em quantidade de indivíduos e número de espécies (Freitas *et al.*, 2015; Rgueira e Bernard, 2012). Após a recepção, os animais devem ser submetidos a protocolos de triagem e reabilitação, visando à sanidade e ao bem-estar animal, como passar por quarentena, exames clínicos e testes comportamentais (Guidelines..., 2002).

Nesse contexto, a adoção de práticas que visem à segurança sanitária, como a realização de exames bacteriológicos, é fundamental, pois as aves provenientes do tráfico passam por situações estressantes e são mantidas em ambientes insalubres, condições as quais favorecem a contaminação oral-fecal dos espécimes por bactérias da família Enterobacteriaceae, devido ao potencial e ao patogênico zoonótico, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, especialmente as cepas diarreogênicas (EPEC, STEC, EIEC, EAEC, ETEC), as quais possuem grande relevância para a saúde pública (Mariotto-Gonçalves *et al.*, 2010; Braconaro *et al.*, 2015; Matias *et al.*, 2016).

Diante do exposto e devido à relevância do tema quanto à escassez de informações, o objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *E. coli* e *Salmonella* spp., identificar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos, bem como avaliar a presença de genes de

virulência em cepas de *E. coli* provenientes de Passeriformes silvestres recuperados do tráfico de animais e mantidos no Cetas/CE.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados suabes cloacais em 120 Passeriformes silvestres nativos, que foram recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres – Cetas do Ibama, situado em Fortaleza, Ceará, Brasil, no período de maio a setembro de 2016. As aves pertenciam a 25 espécies e a quatro famílias: Thraupidae, Turdidae, Cardinalidae e Icteridae (Tab. 1). Este estudo foi submetido ao Sisbio e aprovado por ele (53106-1), assim como pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (Ceua) da Universidade Estadual do Ceará, sob o número 2204213.

Após a coleta, os suabes foram acondicionados em tubos de ensaio contendo 5mL de água peptonada (Himedia, Mumbai, Índia), os quais foram dispostos em caixa isotérmica com gelo reciclável e transportados ao Laboratório de Estudos Ornitológicos da Universidade Estadual do Ceará, a fim de proceder ao isolamento e à identificação morfológica e bioquímica das cepas bacterianas. O protocolo de isolamento de *E. coli* e *Salmonella* spp. foi executado segundo as recomendações de Koneman *et al.* (2012).

A incubação das amostras ocorreu em estufa bacteriológica, por 24h/37°C (tempo e temperatura padrão utilizados em todas as etapas subsequentes). Em seguida, 1mL da solução foi transferido para tubos contendo caldo selenito cistina (Himedia, Mumbai, Índia) e para tubos com caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia, Mumbai, Índia). Posteriormente, o plaqueamento ocorreu com o auxílio de alça de platina, quando alíquotas dos caldos foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey ou ágar eosina azul de metileno (EMB) e em placas com ágar entérico Hektoen e *Salmonella-Shigella*.

As colônias foram selecionadas (aspecto morfológico e fermentativo) e transferidas para tubos contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI), quando foram iniciados os testes bioquímicos. Após 24h, foram selecionadas as cepas de bactérias que expressaram as características clássicas fermentativas de *E. coli* e *Salmonella* spp., as quais foram submetidas aos testes ágar lisina ferro (LIA), ágar SIM (sulfeto, indol e

motilidade), reação de Voges-Proskauer, vermelho de metila, citrato, malonato e ureia. Procedeu-se à leitura e interpretação do perfil

bioquímico para identificação das bactérias, de acordo com os parâmetros apresentados por Bergey e Holt (1994) e Koneman *et al.* (2012).

Tabela 1. Passeriformes alojados no Centro de Triagem de Animais Silvestres/CE e submetidos à análise microbiológica

Nome comum	Nome científico	Família	Quantidade (n)	Porcentagem em relação ao número total de aves (%)
Bicudo	<i>Cyanoloxia brissonii</i> (Lichtenstein, 1823)	Cardinalidae	04	3,3
Azulão	<i>Molothrus bonariensis</i> (Gmelin, 1789)	Icteridae	01	0,8
Corrupião	<i>Icterus jamacaii</i> (Gmelin, 1788)	Icteridae	03	2,5
Graúna	<i>Gnorimopsar chopi</i> (Vieillot, 1819)	Icteridae	04	3,3
Papa-arroz	<i>Chrysomus ruficapillus</i> (Vieillot, 1819)	Icteridae	02	1,7
Primavera	<i>Icterus cayanensis</i> (Linnaeus, 1766)	Icteridae	01	0,8
Sabiá-da-praia	<i>Mimus gilvus</i> (Vieillot, 1807)	Mimidae	01	0,8
Abre-e-fecha	<i>Lanio pileatus</i> (Wied, 1821)	Thraupidae	04	3,3
Bigodeiro	<i>Sporophila lineola</i> (Linnaeus, 1758)	Thraupidae	07	5,8
Caboclinho	<i>Sporophila bouvreuil</i> (Statius Muller, 1776)	Thraupidae	01	0,8
Canário-da-terra	<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	Thraupidae	04	3,3
Canário-pirrita	<i>Sicalis luteola</i> (Sparman, 1789)	Thraupidae	03	2,5
Cardeal	<i>Paroaria coronata</i> (Miller, 1776)	Thraupidae	01	0,8
Galo-de-campina	<i>Paroaria dominicana</i> (Linnaeus, 1758)	Thraupidae	47	39
Golinha	<i>Sporophila albogularis</i> (Spix, 1825)	Thraupidae	06	5,0
Papa-capim	<i>Sporophila nigricollis</i> (Vieillot, 1823)	Thraupidae	10	8,3
Pipira-preta	<i>Tachyphonus rufus</i> (Boddaert, 1783)	Thraupidae	01	0,8
Saí-andorinha	<i>Tersina viridis viridis</i> (Illiger, 1811)	Thraupidae	01	0,8
Sanhaçu-cinzento	<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	Thraupidae	02	1,7
Sanhaçu-do-coqueiro	<i>Tangara palmarum</i> (Wied, 1823)	Thraupidae	03	2,5
Sanhaçu-macaco	<i>Tangara cayana</i> (Linnaeus, 1766)	Thraupidae	02	1,7
Tiziu	<i>Volatinia jacarina</i> (Linnaeus, 1766)	Thraupidae	03	2,5
Trinca-ferro	<i>Saltator similis</i> (d'Orbigny e Lafresnaye, 1837)	Thraupidae	01	0,8
Sabiá-da-mata	<i>Turdus fumigatus</i> (Lichtenstein, 1823)	Turdidae	04	3,3
Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i> (Vieillot, 1818)	Turdidae	04	3,3
Total de espécimes investigadas			120	100,0

Para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, as cepas de *Escherichia coli* foram repicadas em tubos contendo 5mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C/24h. Após a incubação, cada amostra foi plaqueada em ágar MacConkey para a determinação de pureza da cepa. Confirmada essa etapa, colônias foram retiradas da placa e inoculadas em tubos contendo 2mL de solução salina esterilizada. Em seguida, as culturas diluídas na concentração 0,5 da escala de McFarland foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após secagem da superfície do meio, foram depositados os discos contendo os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg),

ceftiofur (30µg), ciprofloxacina (5µg), sulfazotrim (25µg), polimixina B (300 µg), gentamicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), tetraciclina (30µg), azitromicina (15µg) enrofloxacina (5µg), estreptomina (300µg) e norfloxacina (10µg) (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). A leitura foi realizada após 18 a 24h de incubação, por meio da medição dos halos de inibição. Os testes de difusão de disco foram avaliados segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (Performance..., 2014), e os isolados foram classificados quanto à resistência como bactérias sensíveis, de resistência intermediária e de resistência plena, quando não havia formação de halo. Foi considerado bactérias com resistência

total ou bactérias resistentes o somatório dos micro-organismos com resistência plena e intermediária. Empregou-se o termo multirresistência para classificar as cepas resistentes a, no mínimo, três antimicrobianos. A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

O diagnóstico das cepas de *Escherichia coli* diarreogênicas isoladas de suabes cloacais foi baseado na presença de oito genes de virulência de diagnóstico de cinco patótipos de *E. coli*. Para isso, de cada isolado foram recuperadas de três a quatro colônias de cepas anteriormente semeadas em placas contendo ágar MacConkey. Para o teste de PCR, cada amostra representou um *pool*

formado de colônias provenientes de quatro ou cinco isolados diferentes. Foram utilizadas sequências de iniciadores já descritas, sendo: os genes *stx1* (348 pb) e *stx2* (584pb) para identificação de *E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *eltB* (508 pb) e *estA* (147pb) para *E. coli* enterotoxigênica – ETEC; *eaeA* (881pb) e *bfpA* (300pb) para *E. coli* enteropatogênica – EPEC; *ipaH* (483pb) para *E. coli* enteroinvasiva – EIEC; e *aatA* (630pb) e *aaiC* (215pb) para *E. coli* enteroagregativa – EAEC, conforme a Tab. 2 (Taniuchi *et al.*, 2012). As cepas EAEC 042, EHEC O157:H7, EIEC O124, EPEC 2348/69 e ETEC H10407 foram utilizadas como controles positivos das reações.

Tabela 2. Genes e iniciadores utilizados para identificação de *E. coli* diarreogênicas isoladas dos Passeriformes alojados no Centro de Triagem de Animais Silvestres/CE

Genes	Descrição dos genes alvo	Pares de iniciadores oligonucleotídicos (5'-3')	Amplicons (pb)
<i>stx1</i>	STEC	ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG ACAAATTATCCCCTGAGCCACTATC	348
<i>stx2</i>	STEC	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCG TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	584
<i>eltB</i>	ETEC	TTCCCACCGGATCACCAA CAACCTTGTGGTGCATGATGA	508
<i>estA</i>	ETEC	TTCACCTTTCGCTCAGGATG AGCACCCGGTACAAGCAG	147
<i>eaeA</i>	EPEC	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG CAAAGCGCACAAAGACTACCA	881
<i>bfpA</i>	EPEC	GGAAGTCAAATTCATGGGGG GGAATCAGACGCAGACTGGT	300
<i>ipaH</i>	EIEC	CCTTTTCCGCGTTCCTTGA CGGAATCCGGAGGTATTGC	483
<i>aatA</i>	EAEC	CTGGCGAAAGACTGTATCAT TTTTGCTTCATAAGCCGATAGA	630
<i>aaiC</i>	EAEC	ATTGTCCTCAGGCATTTTAC ACGACACCCCTGATAAACAA	215

Adaptação de Taniuchi *et al.* (2012).

A extração de DNA ocorreu pelo método de ebulição (Lima *et al.*, 2013). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se a enzima GoTaqGreen (Promega) e iniciadores a 0,4uM em termociclador MyCycler Thermal Cycler (Biorad, CA, EUA), com o seguinte protocolo: 95°C por 15min; 40 ciclos de 95°C por 30s, 57°C por 30s e 72°C por 1min; e 72°C por 10min. Os produtos foram visualizados a partir de eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo corados por brometo de etídeo e identificados em transiluminador ChemicDoc XRS System (Biorad, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de isolamento de *E. coli* obtida neste estudo foi de 40,8% (49/120), podendo ser considerada elevada, visto que pássaros de hábitos alimentares granívoros e frugívoros saudáveis tendem a apresentar microbiota entérica unicamente composta por bactérias Gram-positivas, e a detecção de Gram-negativas indica a ruptura nas condições de homeostase (Glonder, 1981). Aparentemente, os Passeriformes expostos aos ambientes insalubres do comércio ilegal estão mais propensos à

contaminação por bactérias Gram-negativas, especialmente por *E. coli*, do que aves mantidas em cativeiro, fato que pode ser evidenciado pelo estudo de Horn *et al.* (2015), os quais detectaram, em 387 suabes cloacais de canários-belgas (*Serinus canaria*), clinicamente saudáveis e criados em gaiolas, um percentual de apenas 3,62%, taxa inferior à obtida no presente trabalho.

Outros estudos envolvendo pesquisa de *E. coli* de suabes cloacais em aves provenientes do comércio ilegal trazem resultados diversificados quanto ao percentual de isolamento. Matias *et al.* (2016) constataram taxa de positividade de 50,48% (52/103), resultado bem próximo aos encontrados nesta pesquisa. Braconaro *et al.* (2015) investigaram a microbiota entérica de 253 pássaros silvestres, pertencentes a 34 espécies diferentes, mantidos em Centro de Reabilitação em São Paulo/SP, e constataram 10,7% (27/253) de isolamento de *E. coli*. Os resultados de Cunha *et al.* (2016), por outro lado, revelam percentuais mais elevados. Esses pesquisadores averiguaram suabes cloacais e de fezes de 49 espécimes de Passeriformes da família Thraupidae, sendo 30 de *Paroaria dominicana* e 19 de *P. coronata*, provenientes do tráfico e mantidos no Centro de Recuperação de Animais Silvestres do Parque Ecológico do Tietê (Cras/Pet), localizado em São Paulo/SP, e identificaram 85,7% (42/49) de amostras positivas para *E. coli*.

Neste estudo, todos os suabes cloacais realizados nos Passeriformes do Cetas/CE foram negativos

para *Salmonella* spp. Apesar da ausência do patógeno, os cuidados sanitários não devem ser descartados, visto que, em determinadas circunstâncias, essa bactéria pode ser eliminada nas fezes das aves de maneira intermitente (Lopes *et al.*, 2014). Adicionalmente, as pesquisas de suabes cloacais envolvendo *Salmonella* em pássaros resgatados do tráfico mostram que a ocorrência desse microrganismo é baixa. Matias *et al.* (2016) investigaram pássaros mantidos no Cetas de Seropédica (RJ) e observaram a presença de apenas uma cepa (0,97%) de *Salmonella* ser. Typhimurium, isolada de espécime de *Sporophila falcirostris*, e duas cepas de *Salmonella* ser. Panama (1,94%), em dois espécimes de *Chrysomus ruficapillus*. Em São Paulo/SP, Cunha *et al.* (2016) detectaram isolamento de *Salmonella* spp. em dois espécimes de *Paroaria dominicana*, com taxa de isolamento de 4% (2/49).

Nesta pesquisa, no que se refere à resistência antimicrobiana, pode-se observar que todos os isolados de *E. coli* foram resistentes à tetraciclina e à norfloxacina, tendo 53,1% das amostras manifestado resistência total à primeira droga, maior percentual entre todos os antibióticos testados. Por sua vez, a taxa de resistência plena à norfloxacina foi de 12,2%, sendo de 100% a da resistência total. Taxas de resistência total igualmente elevada foram observadas para ampicilina, sulfazotrim e gentamicina, que, nos três casos, obtiveram percentuais de 98,0% (Tab. 3).

Tabela 3. Frequência de resistência de cepas *E. coli* isoladas de Passeriformes recebidos no Cetas/CE

	Sensíveis n (%)	Diferentes Graus de Resistência		Resistência Total n (%)
		Intermediária n (%)	Plena n (%)	
Ampicilina	1(2,0)	25(51,0)	23 (46,9)	48 (98,0)
Tetraciclina	-	23(46,9)	26 (53,1)	49(100,0)
Ciprofloxacina	4(8,2)	39 (79,6)	6 (12,2)	45(91,8)
Sufazotrim	1(2,0)	27(55,1)	21 (42,9)	48(98,0)
Gentamicina	1(2,0)	48 (98,0)	-	48(98,0)
Enrofloxacina	14(28,6)	28(57,1)	7 (14,3)	35(77,8)
Estreptomicina	3 (6,1)	40 (81,6)	6 (12,2)	46(95,8)
Ácido nalidíxico	8 (16,3)	22(44,9)	19 (38,8)	41(83,7)
Norfloxacina	-	43(87,8)	6 (12,2)	49(100,0)
Azitromicina	29 (59,2)	16 (32,7)	4 (8,2)	20(40,8)
Polimixina	2 (4,1)	46(93,9)	1 (2,0)	47(95,9)
Ceftiofur	16 (32,7)	29 (59,2)	4 (8,2)	33 (67,3)

Os estudos que associam resistência antimicrobiana a cepas de *E. coli* isoladas de Passeriformes provenientes do tráfico de animais ainda são escassos, por isso o real impacto da comercialização e das criações ilegais dessas aves, principalmente no que se refere ao uso indiscriminado de antimicrobianos e ao seu papel na disseminação dessas bactérias resistentes, ainda precisa ser elucidado. No entanto, Braconato *et al.* (2015) mostraram que as cepas de *E. coli* isoladas de Passeriformes confiscados do tráfico apresentaram taxa de resistência de 100,0% e 7,4% para ampicilina e norfloxacina, respectivamente. A taxa relacionada à ampicilina foi similar à observada nas bactérias isoladas das aves do Cetas/CE (98,0%), entretanto divergente quando comparada à norfloxacina (100,0%). Outro importante resultado que destoa na comparação entre o presente estudo e o de Braconato *et al.* (2015) se refere à eficácia da azitromicina, visto que apenas 28,6% das cepas isoladas foram sensíveis a esse antimicrobiano, tendo sido, nos isolados obtidos das aves do Cetas/CE, o antimicrobiano que apresentou maior grau de sensibilidade (59,2%).

Horn *et al.* (2015) avaliaram isolados de *E. coli* provenientes de canários-belgas (*Serinus canaria*) de criadores que mantinham preocupação em utilizar adequados protocolos sanitários, manejo nutricional e ambientação, e detectaram taxa de resistência antimicrobiana de 64% e 48% para sulfonamidas e tetraciclina, respectivamente. As taxas de resistência em relação a esses antibióticos detectadas com base nas amostras oriundas dos Passeriformes do Cetas/CE foram superiores e podem ter uma relação com possíveis falhas no manejo sanitário das aves antes do resgates.

Relatos científicos acerca de aspectos microbiológicos de psitacídeos recuperados do tráfico de animais são mais comuns e, da mesma forma, trazem resultados variáveis em relação à resistência antimicrobiana e aos fármacos mais eficazes. Invariavelmente, em todas as pesquisas, ocorre elevada taxa de resistência antimicrobiana em relação a uma ou mais drogas específicas. Marietto-Gonçalves *et al.* (2010) verificaram alta resistência à sulfonamida (83,0%) em cepas de *E. coli* obtidas de psitacídeos apreendidos em São Paulo, enquanto Hidasi *et al.* (2013), ao analisarem psitacídeos do Cetas/GO, detectaram as maiores taxas de resistência para tetraciclina (64,5%) e doxiciclina (69,2%). Apesar da necessidade de mais investigações, as elevadas taxas de resistências para diferentes antimicrobianos, observadas em cepas de *E. coli* isoladas de aves provenientes do tráfico de animais silvestres, sugerem relação à utilização indiscriminada dessas drogas. Além disso, a exposição das aves aos ambientes insalubres facilita a transmissão de genes por bactérias resistentes.

Das cepas de *E. coli* isoladas, 61,2% apresentaram-se resistentes a, no mínimo, três antibióticos, o que as classifica como multirresistentes (Tab. 4). Essa taxa pode ser considerada elevada quando comparada à verificada por Horn *et al.* (2015) em *Serinus canaria*, cujo valor encontrado foi de 40,2%. No entanto, os resultados detectados nos pássaros dos Cetas/CE são similares aos de Lopes *et al.* (2015), que identificaram multirresistência em 61,7% das cepas de *E. coli* isoladas de psitacídeos oriundos do comércio ilegal, dado que reforça o malefício das criações ilegais sobre o ponto de vista sanitário para diferentes espécies aviárias.

Tabela 4. Padrão de resistência das cepas de *E. coli* isoladas de Passeriformes recebidos no Cetas/CE

Número de antibióticos	Nº-de resistência total (%)	Número de antibióticos	Nº-de resistência total (%)
0	3 (6,1)	5	2(4,1)
Pelo menos 1	46 (93,8)	6	4 (8,2)
1	14 (28,6)	7	3 (6,1)
>2*	30 (61,2)*	8	4 (8,2)
2	2 (4,1)	9	3 (6,1)
3	3 (6,1)	10	1 (2,0)
4	9 (18,4)	11	1 (2,0)

* Valores associados à taxa de bactérias multirresistentes.

Quanto à análise dos genes de virulência, os isolados de *E. coli* apresentaram positividade para importantes fatores, visto que foram detectados os genes *aaiC*, *stx1* e *eaeA* associado ou não ao *bfpA* (Tab. 5). De maneira similar, Matias et al. (2016) identificaram, em cinco isolados de *E. coli*, o gene *eaeA*, nas espécies:

Chrysomus ruficapillus, *Sporophila albogularis*, *Turdus albicollis*, *Tangara sayaca* e *Gnorimopsar chopi*. O gene *stx2* foi detectado em um isolado de *Gnorimopsar chopi*. Braconaro et al. (2015) isolaram apenas um gene de virulência em 27 isolados de *E. coli*.

Tabela 5. Relação entre amostras, família aviária da qual a cepa foi isolada, genes detectados e classificação do patotipo

Nº Pool	Nº de amostras	Família	Gene (s) detectado(s)	Patotipo
01	5	Thraupidae	<i>aaiC</i>	EAEC
02	5	Turdidae	<i>aaiC</i>	EAEC
03	4	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>bfpA</i> , <i>stx1</i> , <i>aaiC</i>	EPEC típica, EAEC, EHEC
04	4	Cardinalidae/ Thraupidae	<i>aaiC</i>	EAEC
05	4	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>aaiC</i>	EPEC atípica, EAEC, ETEC
06	4	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>aaiC</i>	EPEC atípica, EAEC
07	4	Icteridae	Ø	Ø
08	5	Thraupidae	<i>aaiC</i>	EAEC
09	5	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>aaiC</i>	EPEC atípica, EAEC
10	4	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>aaiC</i>	EPEC atípica, EAEC
11	5	Thraupidae	<i>eaeA</i> , <i>aaiC</i>	EPEC atípica, EAEC

Resultados expressivos foram descritos por Reple et al. (2015), que coletaram amostras de 448 psitacídeos, de espécies domésticas e silvestres, no estado de São Paulo, e identificaram que 14,6% (7/48) das cepas de *E. coli* apresentavam os genes *eaeA* e *bfpA*, o que as classifica como EPEC típicas e 10,42% como EPEC atípicas (5/48). Também foram encontradas 54,5% (6/11) de STEC em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*). Na região metropolitana de Fortaleza, Lima (2016) analisou 182 amostras de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) mantidas em diversos ambientes (cativado domiciliar, lojas de animais, entre outros) e diagnosticou apenas uma cepa de EPEC típica. Em 78 amostras de psitacídeos silvestres, mantidos no Cetas/CE, Lopes et al (2018) observaram que 11 (14,1%) foram positivas para os genes *eaeA* e *bfpA* (com ausência de *stx*), o que as classificou como EPEC típicas e nove (11,5%) foram consideradas EPEC atípicas, por apresentarem apenas o gene *eaeA*, tendo sido ambos os patotipos isolados no presente estudo. Essas duas pesquisas realizadas com psitacídeos domésticos e silvestres, respectivamente, apontam que essas aves podem ser portadoras de cepas de *E. coli* virulentas. No

entanto, comparando os resultados verificados em Passeriformes recuperados do tráfico de animais no estado do Ceará com resultados obtidos em estudos similares realizados em outros estados e com pesquisas em psitacídeos domésticos e silvestres no estado do Ceará, infere-se que os resultados atribuídos às cepas de *E. coli* isoladas dos pássaros do Cetas/CE foram sobremaneira relevantes, pois foi detectada a presença de EPEC típica, EPEC atípica, EHEC, ETEC e EAEC, de modo que foram diagnosticados quatro entre os oito genes pesquisados.

CONCLUSÃO

O presente estudo apontou que as amostras de suabes cloacais oriundas de Passeriformes provenientes do tráfico de animais silvestres foram negativas para *Salmonella*, entretanto verificou-se um elevado percentual de isolados de *E. coli*, assim como alta taxa de resistência aos antimicrobianos testados, além da detecção de genes de virulência de relevância para a saúde pública, *eaeA*, *bfpA*, *aaiC* e *stx1*. Em razão da possibilidade do carreamento de importantes agentes patogênicos, as aves provenientes do

comércio ilegal, mesmo que clinicamente saudáveis, devem ser investigadas no âmbito microbiológico, pois bactérias com potencial zoonótico podem representar uma significativa ameaça tanto à saúde humana quanto à saúde animal.

REFERÊNCIAS

- BERGEY, D.H.; HOLT, J. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore: William & Wilkis, 1994. p.787.
- BRACONARO, P.; SAIDENBERG, A.B.S.; BENITES, N.R. *et al.* Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. *Microb. Pathog.*, v.88, p.65-72, 2015.
- CUNHA, M.P.V.; GUIMARÃES, M.B.; DAVIES, Y.M. *et al.* Bactérias Gram-negativas em cardeais (*Paroaria coronata* e *Paroaria dominicana*) apreendidos do tráfico de animais silvestres. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.53, p.107-111, 2016.
- FREITAS, A.C.P.; OVIEDO-PASTRANA, M.E.; VILELA, D.A.R. *et al.* Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no ano de 2011. *Cienc. Rural*, v.45, p.163-170, 2015.
- GLONDER, G. Occurrence of enterobacteriaceae in feces of granivorous passeriform birds. *Avian Dis.*, v.25, p.195-198, 1981.
- GUIDELINES for the placement of confiscated animals. GLAND, SWITZERLAND: IUCN, 2002. Available in: <<https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/2002-004.pdf>>. Accessed in: 15 Jan. 2016.
- HIDASI, H.W.; MORAES, D.M.C.; LINHARES, G.F.C. *et al.* Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.44, p.1-7, 2013.
- HORN, R.V.; CARDOSO, W.C.; LOPES, E.S. *et al.* Identification and antimicrobial resistance of members from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesqui. Vet. Bras.*, v.6, p.552-556, 2015.
- KONEMAN, E.; WINN, W.J.R.; ALLEN, S. *et al.* As Enterobacteriaceae. In: _____. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p.208-299.
- LIMA, I.F.N.; BOISEN, N.; QUETZ, J.S. *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *J. Med. Microbiol.*, v.62, p.683-693. 2013.
- LIMA, S.V.G. *Pesquisa microbiológica em calopsitas (Nymphicus hollandicus) oriundas de pet shops e residências de Fortaleza, Ceará*. 2016. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- LOPES, E.S.; CARDOSO, W.M.; ALBUQUERQUE, A.H. *et al.* Isolation of *Salmonella* spp. em Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.965-969, 2014.
- LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; MACHADO, D.N. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. *Acta Sci. Vet.*, v.43, p.1313, 2015.
- LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; MEDEIROS, P.H.Q. *et al.* Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.38, p.762-766, 2018.
- MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; ALMEIDA, S.M.; LIMA, E.T.; ANDREATTI-FILHO, R.L. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação para soltura. *Braz. J. Res. Anim. Sci.*, v.47, p.185-189, 2010.
- MATIAS, C.A.R.; OLIVEIRA, V.M.; RODRIGUES, D.P.; SICILIANO, S. Summary of the bird species seized in the illegal trade in Rio de Janeiro, Brazil. *Traffic Bull.*, v.24, p.83-86, 2012.
- MATIAS, C.A.R.; PEREIRA, I.A.; REIS, E.M.F. *et al.* Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Bras. J. Microbiol.*, v.47, p.882-888, 2016.

- MENDES, F.L.S. Apreensão de aves silvestres brasileiras que foram exportadas ilegalmente para Portugal. *Rev. Bras. Zootec.*, v.19, p.56-66, 2018.
- OLIVEIRA, E.S.; TORRES, D.F.; ALVES, R.R.N. Wild animals seized in a state in Northeast Brazil: where do they come from and where do they go? *Environ. Devel. Sustainability*, p.1-21, 2018.
- PAGANO, I.S.A.; SOUSA, A.E.A.B.; WAGNER, P.G.C.; RAMOS, R.T.C. Aves depositadas no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA na Paraíba: uma amostra do tráfico de aves silvestres no estado. *Ornithologia*, v.3, p.132-144, 2009.
- PERFORMANCE standards for antimicrobial susceptibility: twenty-second information supplement – document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Available in: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf>. Accessed in: 3 Feb. 2016.
- REGUEIRA, R.F.S.; BERNARD, E. Wildlife sinks: quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol. Cons.*, v.149, p.16-22, 2012.
- REPLE, J.N.; OLIVEIRA, M.C.V.; OLIVEIRA, M.G.X. et al. Análise filogenética de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e produtoras de toxina shiga (STEC) isoladas de fezes de psitacídeos: avaliação do potencial zoonótico. *Rev. Educ. Cont. Med. Vet. Zootec.*, v.13, p.81-83, 2015.
- TANIUCHI, M.; WALTERS, C.C.; GRATZ, J. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.*, v.73, p.121-128, 2012.