

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO DAS CEPAS DE *Escherichia coli* DE PSITACÍDEOS PROVENIENTES DO TRÁFICO ILEGAL NO CEARÁ

(Isolation and evaluation of the pathogenic potential of *Escherichia coli*
strains of parrots from illegal trafficking in Ceará)

William Cardoso MACIEL^{1*}; Gabrielly Rodrigues LAMEU¹; Elisângela de
Souza LOPES²; Patrícia Vasconcelos ALVES¹; Giovanna Viana
SIQUEIRA¹; Arianne Silva CARREIRA¹

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza,
Ceará. CEP: 60.740-000; ²Médica Veterinária Autônoma; ²Biolab Clínica e Laboratório
Veterinário Ltda, Fortaleza, CE, Brasil. *E-mail: william.maciел@uol.com.br

RESUMO

Os psitacídeos são amplamente comercializados de forma ilegal no Brasil, sendo passíveis de atuarem como fontes de transmissão de micro-organismos potencialmente zoonóticos, como a bactéria *Escherichia coli*. No presente estudo, foram isoladas sete cepas de *E. coli* de 30 psitacídeos, provenientes do Centro de Triagem de Animais Selvagens do Ceará - CETAS/CE. Quanto ao potencial patogênico, observou-se 71,4% de positividade para o teste de Vermelho-congo e nenhuma positividade para o teste de atividade hemolítica. Realizou-se um teste de sensibilidade aos antimicrobianos, averiguando a presença de duas cepas multirresistentes. Verifica-se, então, a presença de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas nas aves analisadas, sendo essencial a realização do monitoramento microbiológico dos animais do CETAS, impedindo a disseminação de zoonoses.

Palavras-chave: Aves, tráfico, *Escherichia coli*, zoonose, saúde pública.

ABSTRACT

The psittacine birds are largely traded illegally in Brazil, being capable of acting as sources of microorganisms potentially zoonotic, like *Escherichia coli*. In this study, seven strains of *E. coli* were isolated from 30 birds, housed in the CETAS/CE. Regarding the potential pathogenic, it was observed 71.4% positivity in the Congo red binding test and no test positive for hemolytic activity. It was conducted an antimicrobial susceptibility test, verifying the existence of two multi resistant strains. Then, there is the presence of potentially pathogenic strains of *E. coli* in the birds on this study, being essential the microbiological monitoring of the animals in CETAS, preventing the spread of zoonoses.

Key words: Birds, traffic, *Escherichia coli*, zoonosis, public health.

INTRODUÇÃO

O tráfico de animais silvestres no Brasil é a terceira maior atividade ilegal no mundo, superada somente pelo comércio de armas e de narcóticos. Estima-se que o tráfico de animais silvestres captura cerca de 38 milhões de espécies nativas do Brasil

(RENCTAS, 2018). Em função das condições insalubres impostas às aves durante o transporte e alojamento, é alta a mortalidade dos animais silvestres oriundos de criações ilegais e destinados à comercialização. As aves sobreviventes apresentam-se fragilizadas, sofrendo desequilíbrios de caráter imunológico, que as tornam susceptíveis ao desenvolvimento de infecções primárias e secundárias, principalmente através da atuação oportunista de enterobactérias (KONEMAN *et al.*, 2008).

As bactérias que mais causam mortes e problemas em psitacídeos são as do gênero *Salmonella* e a *Escherichia coli*, responsáveis pela salmonelose e pela colibacilose, respectivamente (LOPES *et al.*, 2016). Dessa maneira, as aves provenientes do tráfico podem ser carreadoras desses agentes patogênicos, que podem representar uma significativa ameaça, não só a saúde animal, como também a saúde humana, visto que trata-se de uma zoonose. Além disso, já foram detectados em passeriformes oriundos do tráfico, *E. coli* contendo genes de virulência de relevância para a saúde pública, tais como *eaeA*, *bfpA*, *aaiC* e *stx1* (GAIO *et al.*, 2019).

Outro aspecto importante envolvendo a microbiota das aves silvestres refere-se ao problema da resistência aos antimicrobianos (TRINDADE e FIGUEIRA, 2018; GAIO *et al.*, 2019). A *Escherichia coli*, por exemplo, se apresenta como uma população de intensa dinamicidade no intestino, possibilitando contínua renovação bacteriana por microorganismos cada vez mais resistentes a antibióticos (PIATTI e BALDASSI, 2007). Esse fator tem se configurado como um obstáculo para a saúde pública, pois a resistência pode ser um risco quando associado ao tratamento de infecções por *Escherichia coli* em humanos (IKUNO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

Diante de tal realidade preocupante, o presente trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação de cepas de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos, provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/CE), conjuntamente com a avaliação de seu potencial patogênico e de sua resistência a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de ética

O presente trabalho foi realizado pela equipe do Laboratório de Estudos Ornitológicos – LABEO, localizado na Universidade Estadual do Ceará – UECE, e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UECE (CEUA/UECE) sob o seguinte nº de protocolo: 127697942 e com o SISBIO com seguinte nº de protocolo: 38345.

Coleta de amostras

As amostras de fezes foram coletadas através de suabes, por via cloacal das aves apreendidas que se encontravam no Centro de Triagem de Animais Selvagens do Ceará (CETAS/CE), de modo que foram avaliados 30 psitacídeos durante o período de novembro de 2012 a fevereiro de 2013. Os suabes foram acondicionados em tubos individuais contendo 10mL de água peptonada a 0,1%, sendo mantidos refrigerados em isopor

contendo gelo reciclado e encaminhados para o Laboratório de Estudos Ornitológicos (LABEO) para a realização do processamento microbiológico.

Processamento microbiológico

As amostras coletadas foram incubadas em estufa bacteriológica por 37 °C durante 24 horas, sendo posteriormente repassado 1mL de cada tubo para os caldos: Selenito, Cistina e *Brain Heart Infusion* (BHI), sendo novamente incubadas durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram plaqueadas em Ágar MacConckey e ágar *Hektoen Enteric* e dispostas na estufa bacteriológica por mais 24 horas. As unidades bacterianas crescidas foram transferidas para tubos com ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, os tubos de TSI que apresentaram crescimento bacteriano com bactérias fermentadoras de açúcares foram selecionados e submetidos à bactéria bioquímica para a identificação bacteriana. Os seguintes testes bioquímicos foram empregados: ágar Lisina Ferro (LIA), SIM Medium, Citrato de Simmons, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), ornitina-descarboxilase, ureia, malonato, lactose, sacarose, manitol, arabinose, raminose, rafinose, sacarose, dulcitol, adonitol, inositol e sorbitol (HOLT *et al.*, 1994; KONEMAN, 2008).

Para a confirmação do resultado da *E. coli*, as amostras que se apresentaram positivas na interpretação do perfil bioquímico, foram semeadas no ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), cuja colônia com coloração esverdeada e de aspecto metálico foi considerada positiva para *E. coli* (FERREIRA e KNÖB, 2000).

Avaliação do potencial patogênico *in vitro* das cepas de *E. coli*

Para avaliação do potencial de patogenicidade das amostras de *E. coli* isoladas, foram empregues os Testes de Vermelho-congo e o de atividade hemolítica em ágar Sangue. Para tanto, as amostras contidas em ágar nutriente foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio TSI e enviadas à estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, para análise do teste de Vermelho-Congo, as bactérias foram semeadas do TSI para placas contendo ágar *Tryptic Soy* acrescido do corante de vermelho congo, sendo, novamente, dispostas em estufa bacteriológica. As amostras positivas foram consideradas por meio da presença de colônias bacterianas vermelhas e as negativas, com coloração pálida 4 (ROY *et al.*, 2006; MARIETTO-GONÇALVES *et al.*, 2010).

Para a verificação do teste de hemólise em ágar Sangue, as amostras foram semeadas do TSI para as placas de ágar Sangue e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias crescidas que apresentaram halo de hemólise total ou parcial circundantes foram consideradas produtoras para hemolisina e as negativas, aquelas que apresentaram ausência de halo (GUASTALLI *et al.*, 2010).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para averiguação da sensibilidade das cepas de *E. coli* isoladas, foram empregados os seguintes antimicrobianos: Ceftiofur, Ciprofloxacina, Enrofloxacin,

Estreptomicina, Gentamicina, Sulfonamida, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Ácido Nalidixíco, Ampicilina, Polimixina B e Tetraciclina.

As colônias bacterianas presentes no Ágar MacConkey foram transferidas para tubo de ensaio contendo solução salina, objetivando-se a turvação do meio. Posteriormente, a solução turva do meio foi repassada para uma placa de petri contendo o ágar *Mueller-Hinton*. Em seguida, foram dispostos no meio os discos contendo os antimicrobianos, posicionados de modo circular e separados entre si. Finalmente, incubaram-se as placas a 37 °C por 24 horas, sendo realizada a leitura dos halos de inibição após esse período de acordo com os padrões estipulados pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

Análise estatística

A interpretação dos resultados foi realizada por meio de uma análise de frequência absoluta e relativa dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizado o isolamento cloacal de sete bactérias identificadas bioquimicamente como *Escherichia coli* em psitacídeos provenientes do CETAS/CE, correspondendo a um percentual de 23,3% (7/30) de aves (Fig. 01). Averiguou-se que as aves, aparentemente, encontravam-se clinicamente saudáveis, não tendo sido perceptível a presença de sinais característicos para colibacilose ou de outras enfermidades.

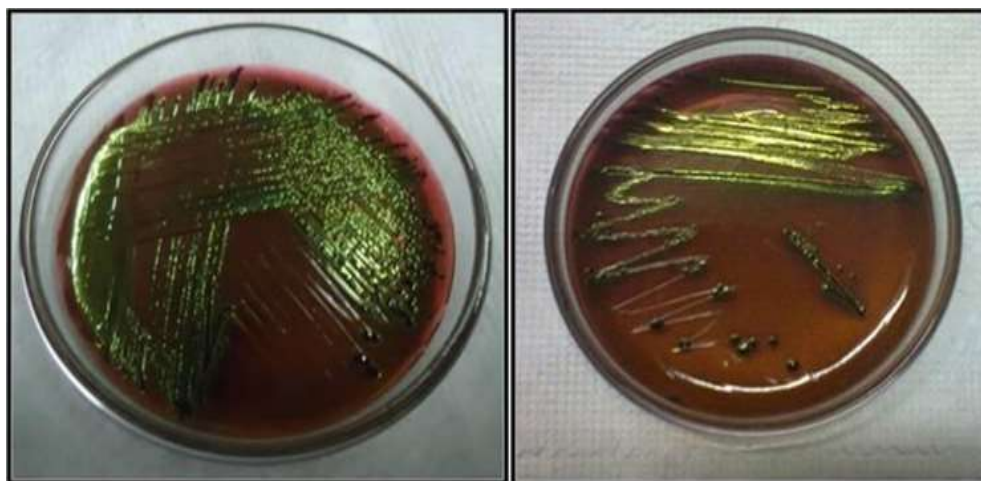


Figura 01: Colônias de *Escherichia coli* em ágar Eosina Azul de Metileno.

Os percentuais de psitacídeos oriundos do tráfico de animais silvestres que são positivos para *E. coli* variam em diversas pesquisas científicas. Desta forma, foi possível encontrar taxas superiores ou inferiores ao detectado nos psitacídeos alojados no CETAS/CE. Marietto-Gonçalves *et al.* (2010) observaram taxas de positividade para *E. coli* de 19,0%, enquanto Hidasi *et al.* (2013) detectaram 57,3%. As taxas de *E. coli*

isoladas vão depender de fatores como o estresse a qual o psitacédeo foi submetido (CORRÊA *et al.*, 2013), assim como da qualidade sanitária das instalações em que as aves se encontram (MATTES *et al.*, 2005).

Quantitativamente o valor encontrado de cepas de *E. coli* não foi elevado, entretanto, a significância está na possibilidade da bactéria possuir fatores de virulência intrínsecos, ou na possibilidade de a bactéria sofrer uma adaptação mutacional que a torne apta a se tornar patogênica à ave silvestre, tornando-a hospedeira de agente etiológico com potencial zoonótico (QUINN *et al.*, 2002; IKUNO *et al.*, 2008).

Em relação à determinação do potencial patogênico, verificou-se a presença de cinco amostras positivas para o teste de Vermelho-Congo (Fig. 02), representando cerca de 71,42% (5/7), enquanto em relação ao teste de atividade hemolítica, nenhuma amostra foi considerada positiva (Fig. 03).



Figura 02: Placas de Ágar Vermelho-Congo contendo colônias de *Escherichia coli*, pálidas e colônias avermelhadas em ambas, representando colônias negativas e positivas, respectivamente.

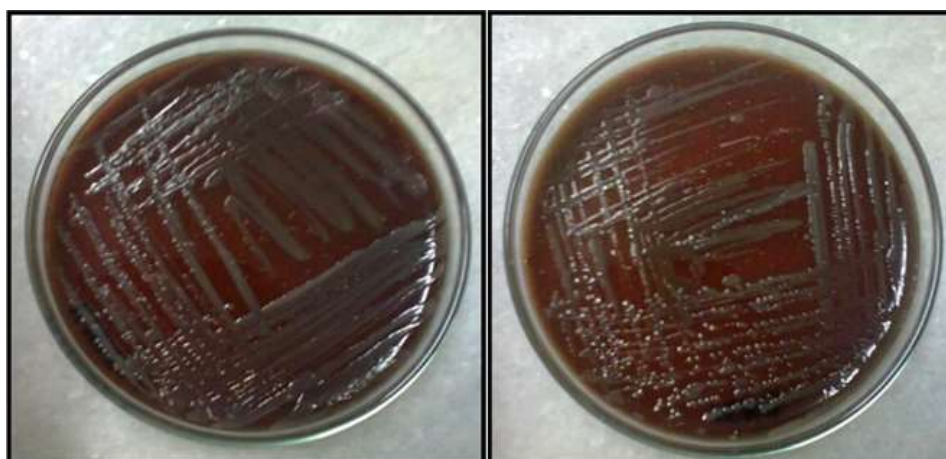


Figura 03: Placas de Ágar-Sangue contendo colônias de *Escherichia coli* com ausência de halos de hemólise ao redor das colônias, representando condições de negatividade.

Assim como o ocorrido na pesquisa de Trindade e Figueira (2018), os quais submeteram isolados de enterobactérias de psitacédeos de cativeiro ao teste de atividade

hemolítica, não foi detectada nenhuma positividade nas cepas oriundas dos psitacídeos do CETAS/CE. Entretanto, os achados referentes ao teste Vermelho-Congo mostram que a maioria das amostras coletadas continham cepas de *E. coli* com potencial patogênico, e isso demonstra que a população da microbiota entérica dessas aves podem estar constituídas não somente por inofensivas bactérias dessas espécies, mas também por patógenos que possam trazer prejuízos à saúde humana e dos animais. Apesar desse relevante achado, a utilização deste teste vem sendo questionado. É um teste que tem sido empregado por diversos estudos para indicar patogenicidade de bactérias (SHARADA *et al.*, 2010; HIDASI *et al.*, 2013). Porém, Sharada *et al.* (2010) consideram que existe forte correlação entre a capacidade bacteriana de se ligar ao corante vermelho congo com o seu potencial patogênico, afirmação corroborada por estudos prévios (CORBETT *et al.*, 1987; QUADRI *et al.*, 1988).

O teste de sensibilidade antimicrobiana demonstrou que três amostras das sete avaliadas (42,8%) apresentavam resistência a pelo menos um dos antibióticos testados (Tab. 01). Todas as três apresentaram resistência a ampicilina, mas nenhuma apresentou à ceftiofur e polimixina B. A multirresistência nas duas amostras ocorreu em relação aos seguintes antibióticos: ampicilina, gentamicina enrofloxacina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetropim, ciprofloxacina, sulfonamida, estreptomicina e ácido nalidíxico.

Tabela 01: Perfil de sensibilidade de antimicrobianos de isolados de *E. coli* oriundas de psitacídeos alojados no Centro de Triagem de Animais Selvagens do Ceará (CETAS/CE).

Antibióticos	Amostras resistentes (+)						
	1	2	3	4	5	6	7
Ceftiofur							
Ciprofloxacina				+			+
Enrofloxacina				+			+
Estreptomicina				+			+
Gentamicina				+			+
Ácido nalidíxico				+			+
Ampicilina	+			+			+
Polimixina B							
Tetraciclina				+			+
Sulfametoxazol + Trimetropim				+			+

Embora a maioria das amostras (5/7) tenham se apresentado sensíveis à maioria ou a todos os antimicrobianos testados, a múltipla resistência revelada por essas duas amostras é um achado relevante, principalmente, quando quatro dessas drogas (enrofloxacina, tetraciclina, ampicilina e gentamicina) são rotineiramente empregadas no tratamento de colibacilose em aves (FERREIRA e KNÖBL, 2000), o que pode explicar o ocorrido.

Segundo IKUNO *et al.* (2008), na literatura é presenciada uma crescente preocupação com o caráter de resistência bacteriana a antibióticos, principalmente com a facilidade em que tem sido verificada a identificação de micro-organismos multirresistentes, como no presente resultado em que (2/7) se mostraram multiresistentes à antibióticos utilizados rotineiramente para tratamento de colibacilose (Fig. 04). Esse transtorno tem sido associado, principalmente, ao uso indiscriminado e prolongado de concentrações errôneas de antimicrobianos (FERREIRA e KNÖBL, 2000), embora alguns estudos tenham sugerido que a aquisição de resistência esteja associada não somente ao uso inescrupuloso de drogas, mas, também, à transferência de genes entre bactérias de mesma ou de diferentes espécies (HIDASI *et al.*, 2013).

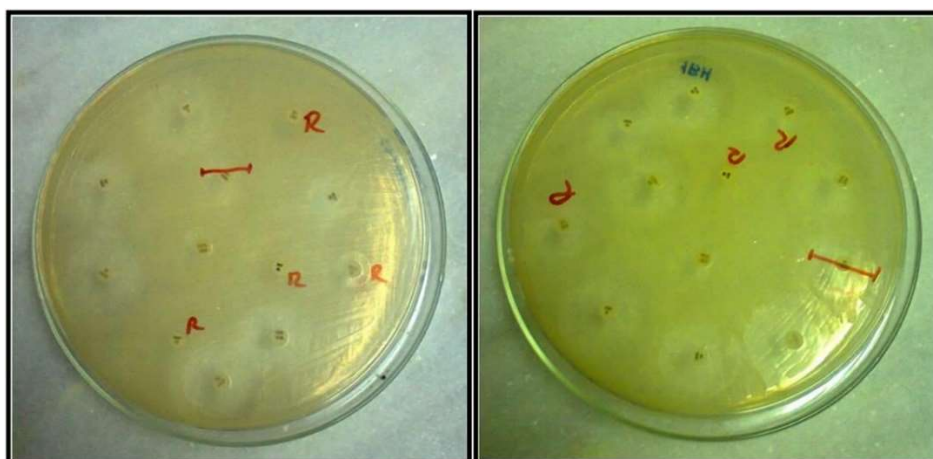


Figura 04: Apresentação dos halos de inibição nas placas de antibiograma.

Dessa forma, uma das grandes adversidades que a resistência das cepas de *E.coli* pode resultar, é a formação de aves selvagens carreadoras, acarretando na transmissão de cepas potencialmente patogênicas e com genes de resistência para outros animais, como para o próprio ambiente, seja no espaço físico do CETAS como na natureza, caso seja realizado a soltura após a reabilitação dessas aves (DOLEJSKA *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

Portanto, foi possível averiguar que os psitacídeos apreendidos do tráfico ilegal albergam cepas de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas a outros animais, inclusive ao homem. Desse modo, institui-se a necessidade emergente de uma política eficaz de fiscalização e combate ao tráfico de animais silvestres, que possa manter um controle do potencial carreador de enfermidades zoonóticas que esses animais representam.

Adicionalmente, é essencial a instalação de um programa rotineiro de monitoramento microbiológico das aves do CETAS/CE, para que se possa realizar o isolamento e identificação de bactérias de importância para a saúde pública, para que se possa instituir um programa de antibioticoterapia adequado, assim como os ajustes significativos no manejo e albergue das aves, possibilitando, então, a soltura de aves em condições fisiológicas condizentes com sua natureza biológica.

REFERÊNCIAS

CORREA, I.M.O.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H.; PEREIRA, L.Q.; BRITO, B.G.; LOVATO, EM. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. Pesquisa Veterinária Brasileira. v.33, n.2, p.241-246, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. 8ª ed., Wayne: Pennsylvania, 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf. Acesso em 11 de novembro de 2013.

DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; LITERAK, I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.11-19, 2007.

FERREIRA, A.J.; KNÖB, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., Doenças das Aves. Campinas: FACTA, p.197-205, 2000.

GAIO, F.C; LOPES, E.S; LIMA, B.P.; CARMO, C.C.; MARQUES, A.R.; OLIVEIRA, F.R.; AMARAL, M.S.M.G.; PASCOAL FILHO, N.M.P.; CARREIRA, A.S., BELEZA, A.J.F.; TEIXEIRA, R.S.C.; HAVT, A; MACIEL, W.C. Bactérias zoonóticas isoladas de Passeriformes silvestres recuperados do tráfico de animais no Estado do Ceará/Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, In Press 2019.

GUASTALLI, E.A.L.; GAMA, N.M.S.Q.; BUIM, M.R.; OLIVEIRA, R.A. FERREIRA, A.J.P.; LEITE, D.S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.77, n.1, p.153-157, 2010.

HIDASI, H.W.; NETO, J.H.; MORAES, D.M.C.; LINHARES, G.F.C.; JAYME, V.S.; ANDRADE, M.A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. *Journal of Zoo and Wildlife medicine*, v.44, p.1-7, 2013.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9ª ed., Baltimore: Willians & Wilkins, p.787, 1994.

IKUNO, A.A.; GAMA, N.M.S.Q.; GUASTALLI, E.A.L.; GUIMARÃES, M.B.; FERREIRA, V.C.A. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: Anais 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet), Gramado, RS, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP,G.; SCHRECKENBERG, P.; WOODS, G. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

LOPES, E. S.; MACIEL, W. C.; TEIXEIRA, R. S. C.; ALBUQUERQUE, A. H.; VASCONCELOS, R. H.; MACHADO, D. N.; BEZERRA, W.G, A .; SANTOS, I. C. L.

Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. Arquivo Instituto Biológico, v.83, p.1-10, 2016.

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 Psittaciforme em fase de reabilitação para soltura. Brazilian Journal Research of Animal Science, v.47, n.3, p.185-189, 2010.

PIATTI, R.M.; BALDASSI, L. Prevalência de *Escherichia coli* O78:K89 na microbiota de aves da região oeste do Estado de São Paulo. Arquivo Instituto Biológico, v.74, n.4, p.357-359, 2007.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, N.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, E.C. Veterinary microbiology and microbial disease. 2^a Ed: Blackwell Science, 2002. 479p.

RENTAS, Rede Nacional contra o Tráfico de Animais Silvestres. Disponível em: <http://www.rentas.org.br/ambientebrasil-trafico-de-animais-silvestres>. Acesso em 19 de dezembro de 2018.

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

ROY, P.; PURUSHOTHAMAN, V.; KOTEESWARAN, A.; DHILON, A.S. Isolation, characterization, and antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from Japanese quail and their environment. Journal of Applied Poultry Research, v.15, p.442-446, 2006.

SANTOS, H.F.; FLORES, M.L.; LARA, V.M.; SILVA, M.S.; LUCIANE, L.B.; LOVATO, L.T. Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.12, p.1077-1082, 2010.

SHARADA, R.; RUBAN, W.; THIVAGEESWARAN, M. Isolation, characterization and antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from poultry. American-Eurasian Journal Science Research, v.5, p.18-22, 2010.

TRINDADE, L.C.; FIGUEIRA, P.T. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e produção de hemolisina de enterobactérias de psitacídeos em cativeiro. PUBVET. v.12, n.3, a49, p.1-5, 2018.