



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE AVES SILVESTRES

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico
Mendes de Conservação da Biodiversidade - PIBIC/ICMBio

Relatório de Acompanhamento
(2016-2017)

**PERFIL SANITÁRIO DE CARDEAIS-AMARELOS (*Gubernatrix
cristata*) EM CATIVEIRO E DE PASSERIFORMES EM ÁREA
SELECIONADA PARA SOLTURA EXPERIMENTAL VISANDO A
REINTRODUÇÃO DE ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA
DE EXTINÇÃO**

Mila Vilá Andrade

**Orientadora:
Patricia Pereira Serafini**

**Florianópolis
Agosto/2017**

Resumo

O cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) sofre grande pressão de captura ilegal desde as décadas de 1970 e 1980. Dentro do âmbito do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho, foi criado o Programa de Cativeiro para o cardeal-amarelo. O presente trabalho propõe a análise de parâmetros de saúde (análises de sangue e a identificação da microbiota cloacal e de orofaringe e a possível resistência à antibióticos) da comunidade de Aves (Passeriformes) presentes na área de soltura experimental de reintrodução e/ou revigoramento de cardeais-amarelos, em Lavras do Sul/RS. Foram realizadas duas expedições de campo para Lavras do Sul/RS e Dom Pedrito/RS para colheita de material biológico. Ensaio microbiológicos e bioquímicos foram realizados seguindo metodologia padronizada. Os grupos identificados foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Serratia* spp., *Ledercia adecarboxylata*, *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter sakazakii*, *Providencia* sp., *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freudii*, *Citrobacter* sp., *Hafnia alvei* e *Klebsiella* sp., sendo 63,3% Gram negativas e 36,7% Gram positivas. Houve resistência de 27,2% dos agentes antimicrobianos testados. Foram coletadas e analisadas dez amostras sanguíneas dos cardeais-amarelos mantidos em cativeiro onde não foram observados hemoparasitas. As bactérias isoladas *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. são consideradas as mais frequentes em quadros septicêmicos de Passeriformes. A tribo *Klebsielleae* inclui quatro gêneros principais – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Hafnia* – contendo, cada um deles, várias espécies que são patógenos reconhecidos e oportunistas nos seres humanos. O gênero *Citrobacter* pode ser encontrado em fezes humanas e de animais e é considerado como parte da flora intestinal. Estas informações são inéditas para a espécie e referências anteriores não estão disponíveis para comparação, contudo monocitose, linfocitose e heterofilia foram observados em alguns animais de cativeiro e precisam ser melhor investigados para compreender sua causa e consequências para a conservação.

Palavras-chave: Campos Sulinos, Reintrodução, Microbiologia.

Abstract

The yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*) has been under great pressure from illegal pet trade since the 1970s and 1980s. Within the scope of the National Plan of Action for the Conservation of Threatened Grassland Passerines, it was created the Captive Recovery Program for the Yellow Cardinal. The present work proposes the analysis of health parameters (blood tests and identification of cloacal/oropharyngeal microbiota and resistance to antibiotics) of bird community, mainly Passeriformes, present in the experimental release area for the species reintroduction (Lavras do Sul / RS). Two field expeditions to Lavras do Sul/ RS and Dom Pedrito/ RS were carried out to collect biological samples. Microbiological and biochemical tests were performed following a standardized methodology. The groups identified were *Echerichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Serratia* spp., *Ledercia adecarboxylata*, *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter sakazakii*, *Providencia* sp., *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freudii*, *Citrobacter* sp., *Hafnia alvei* e *Klebsiella* sp., being 63,3% Gram negative and 36,7% Gram positive. There was resistance of 32,4% of the antimicrobial agents tested. Ten blood samples were collected and analyzed from yellow cardinals kept in captivity where hemoparasites were not observed. The isolated bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus* are considered to be the most frequent bacteria in the septicemia of Passeriformes. The *Klebsielleae* tribe includes four major genera - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Hafnia* - each containing several species that are pathogenic and opportunistic pathogens in humans. The genus *Citrobacter* can be found in human and animal feces considered as part of the intestinal flora. This information is novel for the species and previous references are not available for comparison, however, monocytosis, lymphocytosis and heterofilia have been observed in some captive animals and need to be better investigated to understand their cause and consequences for conservation.

Key-words: Grasslands, Reintroduction, Microbiology.

Lista de Tabelas

TABELA 1: OCORRÊNCIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NAS AMOSTRAS DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO (PARQUE DAS AVES).....	16
TABELA 2: OCORRÊNCIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NAS AMOSTRAS DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO (PARQUE DAS AVES).....	17

Lista de Figuras

FIGURA 1: RESULTADOS DOS TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	15
FIGURA 2: OCORRÊNCIA DOS GRUPOS DE BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	15
FIGURA 3: OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS.	16

Lista de Abreviaturas

AMC	Amoxicilina
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZI	Azitromicina
BHI	Brain Heart Infusion
CFE	Cefalexina
CIP	Ciprofloxacina
ENO	Enrofloxacina
EPI	Equipamentos de proteção individual
EPM	Rugai sem Sacarose
ESEC	Estação Ecológica
GEN	Gentamicina
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
LTD	Meio para hidrólise da ureia e desaminação do triptofano
MiLi	Meio para Motilidade, Indol e Lisina
NCLI	National Conservation Leadership Institute
PAN	Programa de Ação Nacional
PEN	Penicilina
PPT	Proteína plasmática total
SUL	Sulfonamida
TET	Tetraciclina
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidades formadoras de colônias
χ^2	Símbolo do teste estatístico de Qui quadrado

Sumário

1. Resumo	i
2. <i>Abstract</i>	ii
3. Lista de Tabelas	iii
4. Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	iv
5. Sumário.....	v
6. Introdução.....	7
7. Objetivos.....	9
8. Material e Métodos	10
10. Resultados.....	13
11. Discussão e Conclusões.....	18
12. Recomendações para o Manejo	21
13. Agradecimentos	22
14. Referências bibliográficas.....	23

Introdução

A biodiversidade tem papel central para a espécie humana. Animais, plantas e microrganismos fornecem alimentos, medicamentos e matérias-primas, e é nossa conexão mais evidente com a natureza. A atividade humana tem degradado diferentes ecossistemas naturais da Terra e como resultado, há perda de espécies em taxas nunca registradas no planeta (PEREIRA et al., 2013). A extinção de uma espécie é um evento irreversível, que apaga definitivamente uma história evolutiva única e que pode colapsar as redes de interação que mantêm o funcionamento saudável dos ecossistemas.

Ao promover relações mais harmônicas com os recursos vivos da Terra, o uso sustentável da biodiversidade forma a base de uma poderosa racionalidade econômica e reforça nossos vínculos éticos, culturais e científicos com o mundo natural (PEREIRA et al., 2013). Entende-se que é possível a diminuição e prevenção de determinadas situações ambientais negativas, por meio da ação planejada das atividades humanas, e assim tomar decisões estratégicas que podem tanto representar a conservação de ambiente naturais quanto o seu uso irrestrito.

A partir da criação de Planos de Ação Nacionais para a Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção (PANs) criam-se instrumentos para a definição de ações *in situ* e *ex situ* para a conservação e restauração de populações viáveis dessas espécies ameaçadas de extinção. Nessa esfera, são elaborados, conduzidos e regulamentados os Programas de Cativeiro de Espécies Ameaçadas em conformidade com a Instrução Normativa Nº 22, de 27 de março de 2012, estes são estabelecidos por meio de portaria específica pelo Presidente do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio), atendendo as necessidades individuais das espécies identificadas no PAN. O Programa de Cativeiro do Cardeal Amarelo (*Gubernatrix cristata*) está estabelecido no PAN para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho, estabelecido por meio da Portaria Nº 21, de 30 de abril de 2014 (SERAFINI, 2014).

Os Campos Sulinos são ecossistemas naturais com rica diversidade da fauna e flora que abrigam algumas das maiores concentrações de vida silvestre do planeta (TGCI, 2008), porém sofrem diversas ameaças atualmente. A maior parte dessas ameaças provém diretamente de atividades antrópicas, sendo a perda e a degradação de habitats o fator de pressão mais impactante (SERAFINI, 2014). Os Campos Sulinos vêm sendo comprometidos devido à degradação e fragmentação do seu habitat por meio da conversão dos campos nativos para silvicultura (plantações de eucalipto), rizicultura e

plantações de soja. Em termos de abrangência espacial, magnitude e irreversibilidade dos impactos, a conversão das pastagens nativas em outros usos é, de longe, o mais importante fator que contribui para o declínio da fauna dos Campos Sulinos. (PILLAR et. al, 2009). Contudo estas reduções da populações naturais são agravadas pela captura para o comércio ilegal de aves.

Devido a esses fatores mencionados, o cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) sofre grande pressão desde as décadas de 1970 e 1980, onde já era considerado escasso no Brasil. A pressão de captura sobre a espécie é intensa, e a tendência é a sua rápida extinção no país se as devidas providências não forem tomadas para coibir a retirada de exemplares da natureza e para tentar recuperar as populações viáveis no ambiente natural (SERAFINI, 2014).

O cardeal-amarelo, objeto de estudo do presente trabalho, é uma das espécies criticamente ameaçadas de extinção contempladas pelo PAN por meio de programas de conservação *ex situ*, cujo objetivo é formar populações em cativeiro com espécimes oriundos de diferentes populações, a fim de aumentar a variabilidade genética dos grupos, reduzir os efeitos da depressão por endocruzamento e restabelecer populações em áreas onde a espécie tenha desaparecido através de programas de reintrodução.

Desde 2014, no âmbito do programa de cativeiro, mantenedores no Rio Grande do Sul e no Paraná tem se dedicado à manutenção e reprodução de cardeais-amarelos em cativeiro e a equipe envolvida no Programa de Cativeiro tem se dedicado à identificação de áreas potenciais para a reintrodução da espécie em locais em que a mesma foi extirpada devido à captura ilegal para o tráfico de animais silvestres. Durante o manejo em cativeiro foram identificadas complicações relacionadas à saúde das populações e baixo índice de sucesso reprodutivo para a espécie nos mantenedores vinculados ao programa. Para monitorar a saúde destas populações em cativeiro e orientar seu manejo, bem como para atender às demandas apresentadas pela Instrução Normativa N° 23, de 31 de dezembro de 2014, em relação aos procedimentos prévios para a reintrodução e/ou revigoramento populacional de espécies no ambiente natural, faz-se necessário à realização de diversos diagnósticos sanitários. Diante disso, o presente trabalho propõe a análise de parâmetros de saúde da comunidade de Aves, principalmente de Passeriformes, presentes na área de soltura experimental de reintrodução no município de Lavras do Sul/RS e região, bem como propõe a continuidade do monitoramento da saúde das populações mantidas em cativeiro em instituições vinculadas ao programa. Parâmetros microbiológicos e hematológicos são o foco deste estudo.

Objetivos

O presente trabalho se propôs a ampliar as investigações sanitárias dos indivíduos cativos acrescentando também inéditas análises de sangue (hematologia), bem como a identificação da microbiota cloacal e de orofaringe dos cardeais amarelos.

O Objetivo Geral desta pesquisa é orientar decisões que embasarão a soltura experimental de *Gubernatrix cristata*, prevista inicialmente para final de 2017, no Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo. Os objetivos específicos incluem investigar padrões hematológicos e identificar a microbiota cloacal e de orofaringe da Comunidade de Aves (Passeriformes) nos locais potenciais para soltura selecionados no município de Lavras do Sul/RS e de cardeais-amarelos (*Gubernatrix cristata*).

Material e métodos

Área de estudo

A área de estudo do presente trabalho inclui a região fisiográfica da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, no Bioma Pampa, nos municípios de Lavras do Sul e Dom Pedrito, cerca de 350 km de Porto Alegre. A região, de relevo ondulado com altitudes de 150 a 500 m, geologicamente é a região mais antiga do Estado, Escudo Granítico, Planalto Sul-Riograndense (Boldrini 1997). A precipitação média anual é de 1.350 mm e a temperatura média anual é de 17 °C (Girardi-Deiro *et al.* 2002). Porto (2002) classifica as formações vegetais como campestres e florestais de pequeno porte, os campos sendo do tipo sujo e vassourais, onde se estabelece uma tipologia de campo dotada de fisionomia grosseira, aproximando-se à savana. Bencke (2009) destaca a rica diversidade da avifauna da região. Apesar da prospecção ter sido em toda a Serra do Sudeste, as áreas de colheita das amostras biológicas concentram-se no município de Lavras do Sul/RS, área identificada como local potencial para a soltura experimental de cardeais-amarelos. Estão sendo analisadas ainda amostras de cardeais-amarelos recém-incorporados ao programa de cativeiro e que fazem parte do plantel do mantenedouro Parque das Aves, localizado em Foz do Iguaçu/PR, instituição que solicitou entrada no programa oficial em 2016, bem como eventuais cardeais-amarelos capturados em vida livre.

Coleta de amostras

O processamento das aves silvestres ocorreu com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), incluindo óculos de proteção, máscara e luvas de látex. Todos os *swabs* contendo as amostras foram armazenados no meio de transporte Stuart e em transportados ao Laboratório de Análise de Águas e Microbiologia da Estação Ecológica de Carijós (ESEC Carijós), Florianópolis/SC. Depois de um período de, no máximo, 48 horas após a coleta das amostras, estas foram repicadas no meio *Brain Heart Infusion* (BHI) – um meio altamente nutritivo para microrganismos – onde ficaram por 24 horas à 37°C. Após esse período, utilizou-se 70µl da amostra em 30µl de glicerina estéril a fim de conservar as amostras e permitir a subsequente análise. Posteriormente, as amostras foram congeladas à -20°C com o propósito de conservar as estruturas celulares dos microrganismos.

Análise do material microbiológico

A análise do material microbiológico iniciou-se com o descongelamento de duas a três amostras por semana e semeadura em placas de Petri com Ágar MacConkey, este seletivo para bactérias Gram negativas, e em Ágar Sangue; em seguida foram mantidas na estufa a 37°C por um período de 18 a 24 horas. Após esse acondicionamento, foi feita a descrição morfológica das colônias, segundo critérios de WINN *et al.* (2012) e coloração de Gram (New Prov, Santa Cecília, SP). Para colônias Gram positivas presentes no Ágar Sangue, foi feito o teste da catalase, que aponta a presença desta enzima. Para a realização de tal teste, adiciona-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em uma colônia isolada. A presença da catalase permite separar os estreptococos catalase negativa de outros cocos Gram-positivos produtores de catalase, por exemplo, estafilococos. Nas colônias Gram negativas, presentes em Ágar MacConkey, foi feito o teste de oxidase em fita (New Prov, Pinhais, PR).

Foram realizados oito testes bioquímicos a partir de colônias puras contidas em Ágar MacConkey, estas repicadas no *Enterokit B* (Probac do Brasil, São Paulo, SP), este possui três meios: 1) EPM – contendo testes de fermentação e produção de gás em glicose, produção de H₂S, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano; 2) MILi – contendo testes de motilidade, indol e descarboxilação de lisina; 3) Citrato de Simmons – oferecendo o citrato como única fonte de carbono. Adicionalmente, utilizamos o Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) que possibilita o diagnóstico da fermentação de três açúcares e a produção de ácido sulfídrico (H₂S) das amostras. Todas as semeaduras foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical, proporcionando à pesquisa um ambiente de trabalho estéril.

O Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) baseia-se na metodologia descrita por Kirby & Bauer (1966); é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos. A técnica tem como princípio o preparo de uma suspensão de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em solução salina (0,85%) até atingir turbidez similar ou igual a 0,5 na escala *Mac Farland* (1x10⁶ UFC/mL). Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril, são semeadas em Ágar Müller Hinton. Foram utilizados onze discos de antibióticos: gentamicina (GEN), penicilina (PEN), azitromicina (AZI), sulfonamidas (SUL), ciprofloxacina (CIP), e enrofloxacina (ENO) para as bactérias identificadas como gram positivas; tetraciclina (TET), cefalexina (CFL), ampicilina (AMP), amicacina (AMI), amoxicilina (AMC) para as bactérias gram negativas. Após 24 horas a 37°C na estufa, foi feita a medição do halo

de inibição, este classifica a bactéria como sensível, intermediária ou resistente, segundo Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico (NCCLS, 2003) e Marinho *et. al*, 2002.

Coleta e avaliação morfológicas de amostras de sangue

As coletas de sangue são realizadas por venopunção da veia ulnar ou da jugular. Serão coletados no máximo 1% do peso corporal de cada ave, utilizando agulhas descartáveis (13x4,5mm) e tubos de microhematócrito. Após a coleta de sangue, é feita extensão sanguínea, para avaliação da morfologia, a distribuição das células sanguíneas e a presença de hemoparasitas. O volume restante das amostras de sangue segue para microtubos (tipo *Eppendorf*) previamente identificados. Os microtubos são mantidos em caixas refrigeradas para serem encaminhados sob refrigeração ao Laboratório.

A avaliação morfológica ocorre com a contagem diferencial de leucócitos (totalizando 100 leucócitos), esta classifica os leucócitos em heterofilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e quanto à presença de hemoparasitas. A análise dos eritrócitos dá-se quanto a sua forma, cor, imaturidade. Para a realização de tais análises, utilizamos uma lâmina para microscópio para cada amostra, lâmina extensora, corante de Wright e microscópio óptico.

O presente projeto tem sido implementado no âmbito da autorização SISBIO 53935, cuja pesquisadora proponente é a orientadora deste projeto.

Resultados

Até o momento foram realizadas duas expedições de campo para Lavras do Sul/RS e Dom Pedrito/RS durante o período de vigência da bolsa para identificação dos melhores locais de soltura bem como prospecção da comunidade de aves presente e colheita de material. Ao longo das duas expedições de campo realizadas foram capturadas em redes de neblina e anilhadas as seguintes espécies de aves da Ordem Passeriformes: cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*), alegrinho (*Serpophaga subcristata*), cardeal (*Paroaria coronata*), azulão (*Cyanoloxia brissonii*), Bichoita (*Schoeniophylax phryganophilus*), corruíra (*Troglodytes musculus*), quem-te-vestiu (*Poospiza nigrorufa*), tico-tico (*Zonotrichia capensis*) e canário-da-terra (*Sicalis flaveola*). As coordenadas da localidade onde foram realizadas capturas de aves para colheita de material biológico em Lavras do Sul/RS, de 03 a 05 de outubro de 2016, são: 30°45'50,5"S, 54°14'26,4"W (WGS84). A localização e captura de um cardeal-amarelo na Serra do Sudeste foi muito importante para confirmar e documentar a presença do indivíduo em região em que se acreditava que a espécie estava extinta. O resultado deste trabalho de campo foi extremamente positivo e trouxe nova esperança para a conservação da espécie. Foram coletadas amostras (cloacal e oral) deste cardeal, que permitirão análises genéticas e de saúde desta ave.

Foram também coletadas e analisadas dez amostras sanguíneas dos cardeais-amarelos mantidos em cativeiro. Não foram observados hemoparasitas nas amostras, e no exame diferencial das células de defesa (leucócitos) utilizando-se o esfregaço sanguíneo, observou-se heterofilia, leucocitose e monocitose em algumas das amostras. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2. Foram analisadas trinta amostras microbiológicas coletadas dos Passeriformes de Lavras do Sul/RS, sendo quatorze cloacais e dezesseis orais. Os microorganismos isolados nas aves em vida livre foram *Echerichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Serratia* sp., *Ledercia adecarboxylata*, *Macrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter freudii*. Os microorganismos isolados em animais de cativeiro (Parque das Aves) foram *Serratia plymuthica*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter* sp., *Citrobacter freudii*, *Citrobacter diversus*, *Providencia* sp., *Hafnia alvei*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Klebsiella* sp. Em todas as amostras, 63,3% foram identificadas como Gram negativas e 36,7% como Gram positivas (Figura 3).

Durante as análises, foi observado que *Escherichia coli* é uma bactéria fermentadora de lactose, Gram negativa e sua morfologia é de cocobacilos. O gênero *Staphylococcus* sp. foi observado que as colônias são bactérias Gram positivas e possuem morfologia de cocos e crescem seguindo um padrão que se assemelha a um cacho de uvas.

Nas análises para identificação de *Serratia* sp. (inclui-se *S. plymuthica*, *S. marcescens* e *S. liquefaciens*) foi observado que é uma bactéria com morfologia de cocobacilos e bastonetes e são Gram negativas. As colônias do gênero são conhecidas pela sua pigmentação vermelha que é variável (espécie, tempo e tipo de incubação), porém sempre presente.

No gênero *Macrococcus* as cepas têm a morfologia de cocos, porém maiores (1,1 – 2,5 μm). São Gram positivos e catalase positivo. A espécie *Ledercia adecarboxylata* é um bastonete Gram negativo. Possui forma puntiforme com coloração branca translúcida com o centro branco opaco. A colônia tem tamanho aproximado de 2,5 mm.

O gênero *Bacillus* sp. é Gram positivo com sua morfologia em forma de bastonete e são catalase positivos. O gênero *Providencia* sp. tem forma de cocobacilos, são Gram negativos, H_2S negativo, indol e citrato de Simmons positivo e urease negativo. O gênero *Citrobacter* sp. (inclui-se *Citrobacter diversus* e *Citrobacter freudii*) possui morfologia de cocos Gram negativos. São oxidase negativa, catalase positiva e não descarboxilam a lisina.

As espécies do gênero *Enterobacter* sp. apresentam forma de bastonetes e são Gram negativos. Também são oxidase negativas e fermentadores de glicose. A espécie *Enterobacter sakazakii* é oxidase negativa e produz pigmento amarelo na colônia em ágar. A espécie *Hafnia alvei* é uma bactéria com morfologia de cocos Gram negativos. Não há motilidade e são oxidase negativa e catalase positiva. As bactérias do gênero *Klebsiella* sp. tem forma de bastonetes e são Gram negativas. Tem seu tamanho variando entre 0,5 μm a 2,0 μm .

Os resultados dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, baseado na metodologia descrita por Kirby & Bauer (1966), encontram-se descritos na Figura 1. Os níveis de resistência frente aos antimicrobianos testados foram de 32,4%. Os padrões de resistência antimicrobiana não foram considerados homogêneos ($\chi^2=31,571$, $gl=9$, $p=0,0002361$). As cepas foram significativamente mais resistentes aos antibióticos Amoxicilina (AMC) e Cefalexina (CFE) com 100% de resistência e Ampicilina (AMP), com 88,8%. Os resultados das análises de esfregaço sanguíneo dos animais de cativeiro estão descritos na Tabela 2.

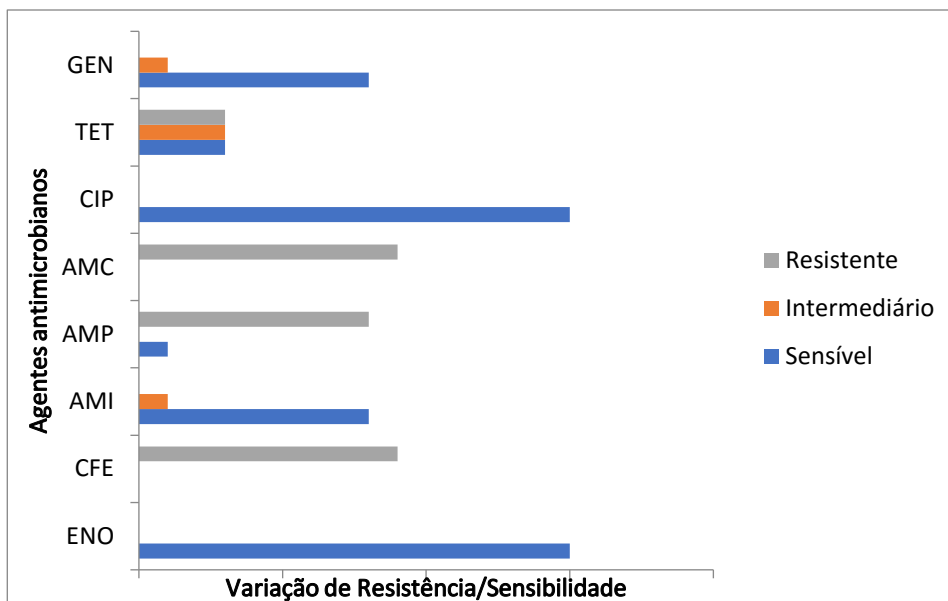


Figura 1: Resultados dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Este gráfico demonstra que, de onze agente antimicrobianos testados, três deles possuem altos índices de resistência nas amostras, são eles: amoxicilina e cefalexina com 100% de resistência e ampicilina com 88,8% de resistência.

(Legenda das siglas: TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; AMC: amicacina; AMP: ampicilina; AMI: amicadina; CFE: cefalexina; GEN: gentamicina; ENO: enrofloxacina.)

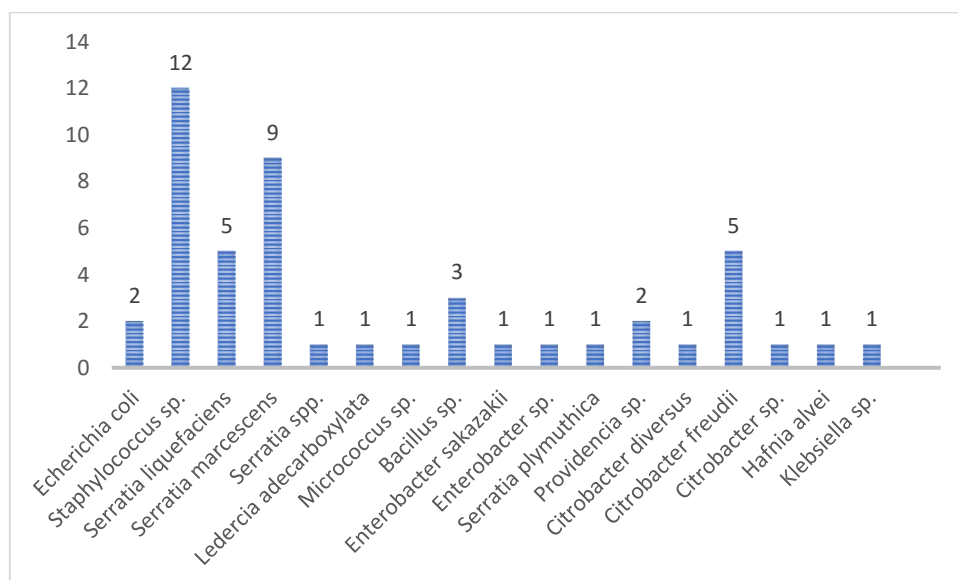


Figura 2: Ocorrência dos grupos de bactérias nas amostras analisadas de vida livre e cativo (Parque das Aves).

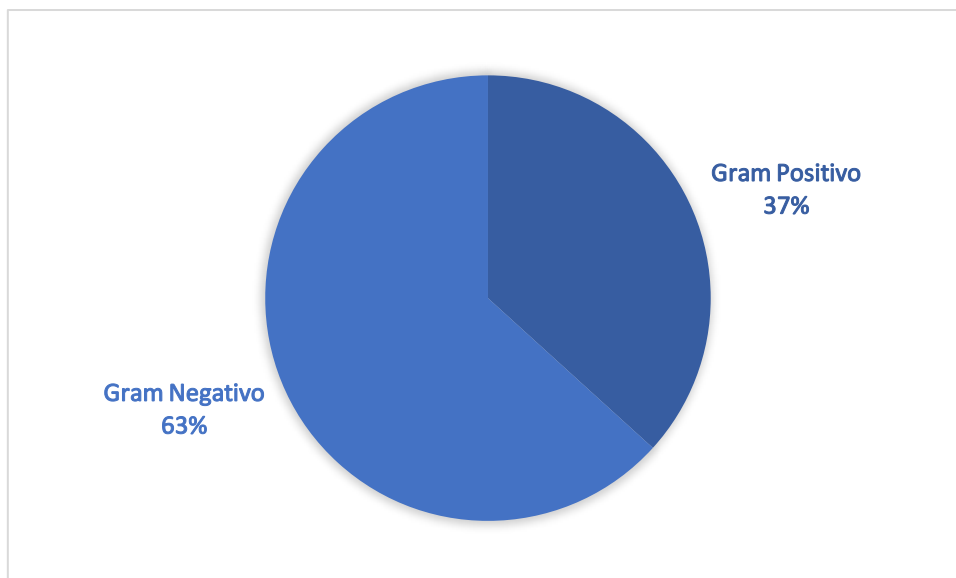


Figura 3: Ocorrência de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Tabela 1: Ocorrência das bactérias isoladas nas amostras de vida livre e de cativeiro (Parque das Aves).

CATIVEIRO (Parque das Aves)	VIDA LIVRE
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Echerichia coli</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Citrobacter freudii</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Serratia</i> sp.
<i>Providencia</i> sp.	<i>Ledercia adecarboxylata</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Macroccoccus</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	<i>Citrobacter freudii</i>

Tabela 2: Resultados das análises dos esfregaços sanguíneos dos animais de cativeiro (Parque das Aves).

Livro tombo	Amostra	Heterófilos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos	Linfócitos	Hemoparasitas
4886	PA 3,5 3401 (filhote)	70	0	0	6	24	Ausente
4848	IBAMA 01.02 8=ES 3,8 0013	34	0	0	8	58	Ausente
4849	0549	58	0	0	0	42	Ausente
4845	IBAMA 01.02 16=PE 3,8 0525	36	0	0	24	40	Ausente
4846	IBAMA 01.02 25=SC 3,8 0637	46	0	0	18	36	Ausente
4850	1733	32	0	0	8	60	Ausente
4842	PCA 057	48	0	0	2	50	Ausente
4844	IBAMA 03.04 3,8 007619	54	0	0	4	42	Ausente
4843	01.02 16 PE 3,8 0076	46	0	0	3	51	Ausente
4847	SEM IDENTIFICAÇÃO (somente livro tombo)	32	0	0	10	58	Ausente

Discussão e Conclusões

Entender a microbiota do sistema gastrointestinal das aves é de grande importância para relacionar a presença de microrganismos e doenças infecciosas (SILVA, 2016). Os microrganismos presentes em aves podem ser classificados como comensais, exercendo funções fisiológicas no organismo, proteção contra infecções e estímulo a resposta imune; ou microrganismos com potencial patogênico (SILVA, 2016).

As bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. *Klebsiella* sp., e *Citrobacter freundii* são consideradas por Godoy (2006) as mais frequentes em quadros septicêmicos de Passeriformes. Uma série de doenças pode ser evidenciada pela associação de Passeriformes com *E. coli*, incluindo diarreia, conjuntivite, rinite, onfalite, salpingite, metrite e septicemia, sendo também encontrada em animais sem sintomatologia clínica (MACWHIRTER, 1994; DORRESTEIN, 1997; FUDGE, 2001; JOSEPH, 2003). Ressalta-se que a infecção por *E. coli* possui importância apenas se detectada patogenicidade na sorotipagem, relacionada às condições precárias de higiene, dieta desbalanceada, problemas de manejo e imunossupressão de ave (GLUNDER, 1981; DORRESTEIN, 1996; DORRESTEIN, 1997; JOSEPH, 2003).

A espécie *Citrobacter freundii* é um agente pertencente à microbiota de trato respiratório e digestório de aves, porém possui alta patogenicidade em aves jovens e imunossuprimidas. Não há manifestações clínicas, depressão, diarreia e óbito súbito. As aves sobreviventes geralmente tornam-se carreadoras do agente (SANCHES & GODOY, 2014). O gênero *Citrobacter* pode ser encontrado em fezes humanas e de animais considerado como parte da flora intestinal.

As espécies do gênero *Serratia* sp. produzem enzimas hidrolíticas, logo, fazem parte do sistema gastrointestinal de vários organismos. A bactéria *Serratia marcescens* está frequentemente associada a uma variedade de infecções humanas. Atualmente é reconhecido como um importante patógeno dotado de propriedades invasoras e com tendência a resistência a muitos antibióticos de uso comum (WINN *et. al.*, 2012). Outra espécie encontrada em análises das amostras foi *Serratia liquefaciens*. Essa bactéria possui propriedades antifúngicas, estimulam o estabelecimento de simbiontes fixadores de nitrogênio, entre outros (WINN *et. al.*, 2012).

Segundo Winn *et. al.*, 2012, os membros do gênero *Macrocooccus* sp. não estão implicados em infecções humanas. A tribo *Klebsiellae* inclui quatro gêneros principais – *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Hafnia* – contendo, cada um deles, várias espécies

que são patógenos reconhecidos e oportunistas nos seres humanos. Uma nova espécie do gênero *Providencia* (*Providencia heimbachae*) foi isolada de fezes de pinguins, mas sem evidência patógena.

É de suma importância o estudo do perfil sanitário das aves submetidas ao Programa de Cativo e de aves de vida livre que se encontram nos locais de soltura, pois ao decorrer das análises serão fornecidos subsídios importantes a respeito da criação em cativeiro e manejo das populações no ambiente natural e, assim, subsidiarão a efetivação do Objetivo específico 3 do Programa de Cativo do Cardeal-amarelo que consiste em realizar experimentos de reintrodução/revigoramento da espécie na Serra do Sudeste, visando desenvolvimento de estratégias de soltura e monitoramento, pois a saúde é um aspecto necessário a todos os processos que envolvam ações de manejo e monitoramento de aves silvestres.

O cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) é uma espécie que ainda sofre intensa pressão de captura e tendência de rápida extinção no país (SERAFINI, 2014). A população em cativeiro no Brasil, concentrada majoritariamente nas mãos de criadores amadoristas, excede a população em vida livre. Dessa forma, podemos inferir que há grande contato de humanos e outros animais domésticos com estas aves, o que pode acarretar transferências de microrganismos e aumento da resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos e, assim, favorecerem o aumento de cepas multirresistentes.

Esses níveis de resistência parecem estar correlacionados com o grau de associação com as atividades humanas (BONNEDAHN & JÄRHULT, 2014), migração das aves e a alimentação no cativeiro, na qual é comum a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento de aves de produção (SANTOS *et. al*, 2010). Logo, o uso extensivo e inapropriado de drogas antimicrobianas está conduzindo ao rápido desenvolvimento de resistência específica nos microrganismos causadores de doenças (MADIGAN *et. al*, 2004). Conquanto, as análises feitas com os animais amostrados até o momento neste projeto sugerem que os índices de resistência a antimicrobianos não estão sendo levados ao ambiente natural de maneira artificial, uma vez que foi identificada resistência dos animais de vida livre amostrados em localidades bastante remotas, estes com índices significativamente altos para 27,2% dos agentes antimicrobianos testados.

Outro fato importante a ser discutido são os termos reintrodução *versus* revigoramento. Com os trabalhos de campo associados a este projeto houve a confirmação da ocorrência do cardeal-amarelo na região da Serra do Sudeste, área onde a espécie

acreditava-se extinta, após 15 anos de busca sem ocorrências confirmadas. Este foi um achado inédito e bastante relevante ao longo do projeto, pois demonstra que o cardeal-amarelo não está confinado ao Parque Estadual do Espinilho, no extremo sudoeste gaúcho como se suspeitava antes. Acerca dos processos de restabelecimento da população da espécie em estudo, podemos concluir que o manejo e o desenvolvimento de estratégias de soltura e monitoramento podem ser alterados devido à confirmação da ocorrência do cardeal-amarelo na área de soltura. O termo “reintrodução” compreende soltar indivíduos retirados do ambiente selvagem ou criados em cativeiro, dentro de uma área de sua ocorrência histórica onde essa espécie não mais existe, e assim garantir adaptação genética ao ambiente (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Comparando com o termo “revigoramento”, que consiste em liberar indivíduos em uma população existente para aumentar o seu tamanho e o seu *pool* genético (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Reintrodução havia sido usado como termo ideal para as solturas da espécie na Serra do Sudeste no Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo até o presente projeto, contudo, com a identificação de indivíduos da espécie na região após o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, a soltura de indivíduos nestas localidades passam a ter uma conotação de revigoramento populacional, a ser subsidiado pelas análises aqui desenvolvidas.

Recomendações para o manejo

A única população do cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) que era conhecida e monitorada no Brasil estava restrita ao Parque Estadual do Espinilho e arredores, no extremo oeste do Rio Grande do Sul. Todavia, a suspeita de que ainda pudesse existir uma pequena população isolada em outra região, a Serra do Sudeste, persistia com base em relatos e evidências indiretas. A partir da confirmação da existência de um indivíduo em uma localidade aonde se acreditava que estava extinto, podemos concluir que a ação de reintrodução, será substituída pelo revigoramento, que tem como objetivo fortalecer e estabelecer o aumento do número de indivíduos da população de cardeais-amarelos.

A descoberta tem implicações para a conservação da espécie, uma vez que será necessário reavaliar as estratégias e envolver um número maior de proprietários de áreas privadas no programa. Ações para a conscientização da população sobre a importância da preservação da biodiversidade é a força motivadora da mudança de atitude e do fim da captura ilegal. A luta contra o tráfico deverá intensificar-se com a fiscalização e a punição aos infratores, a fim de se manter esta ave na natureza. Contudo, a conscientização e a participação das pessoas são fundamentais.

Os dados microbiológicos, de resistência bacteriana e hematologia das aves objeto de estudo foram analisados no período de vigência da bolsa, este projeto soma informações valiosas para a implementação de ações de soltura experimental do Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo, inclusive atendendo a recomendações da Instrução Normativa Nº 23, de 31 de Dezembro de 2014, que define as diretrizes e os procedimentos para a destinação de animais silvestres apreendidos, resgatados por autoridade competente ou entregues voluntariamente pela população.

As informações produzidas neste estudo são dados microbiológicos e fisiológicos inéditos para a espécie e referências anteriores não estão disponíveis para comparação, contudo monocitose, linfocitose e heterofilia foram observados em alguns animais de cativeiro e precisam ser melhor investigados para compreender sua causa e consequências para a conservação.

Agradecimentos

Agradeço a Patricia Pereira Serafini por compartilhar seu conhecimento, dar oportunidade de trabalho e orientação. Ao Rafael Meurer por todo apoio e suporte durante as análises das amostras em laboratório. Ao Claudinei Rodrigues pelo compartilhamento do Laboratório para análises das amostras. A todos os servidores da Estação Ecológica de Carijós, sempre atenciosos e receptivos. E finalmente, ao ICMBio, que oportunizou a minha participação em um projeto de pesquisa para a conservação da biodiversidade nacional e concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências bibliográficas

- BENCKE, G. A. *Diversidade e conservação da fauna dos Campos do Sul do Brasil*. CAMPOS SULINOS, p. 101, 2009.
- BOLDRINI, I.I. 1997. *Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização fisionômica e problemática ocupacional*. Boletim do Instituto de Biociências, 56:1-39.
- BONNEDAHL, J.; JÄRHULT, J. D. *Antibiotic resistance in wild birds*. Upsala Journal of Medical Sciences, 119:2, 113-116, 2014.
- CAMPBELL, T.W. (2004). *Hematologia de aves*. Capítulo 17. p. 215- 247. In Thrall, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Editora Rocca Ltda.
- DORRESTEIN, G. M. *Medicine and surgery of canaries and finches*. In: ROSSKOPF, W. J.; WOERPEL, R. W. Diseases of cage and aviary birds. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, cap. 68, p. 915-927.
- DORRESTEIN, G. M. Passerines. In: ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; QUESENBERRY, K. *Avian medicine and surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. cap. 49, p. 867-885.
- FUDGE, A. M. *Diagnosis and treatment of avian bacterial diseases*. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v.10, n.1, p.3-11, 2001.
- GIRARDI-DEIRO, A. M., OLIVEIRA, A. S. & GOMES, K. E. 2002. *Contribuição ao estudo das gramíneas e leguminosas da Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil*. Revista Científica Rural, 7(1):34-41.
- GLUNDER, G. *Ocurrence of Enterobacteriaceae in feces of granivorous passeriform birds*. Avian Diseases, v. 25, n. 1, p. 195-198, 1981.
- GODOY, S.N. *Patologia comparada de Passeriformes oriundos do tráfico: implicações na soltura*. 2006. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. 109 f.
- HARRISON, L. R. *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, 1994. cap. 43, p. 1173-1198.

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

KLEIMAN, D. G. 1989. *Reintroduction of captive mammals for conservation*. BioScience 39: 152-161.

LABORCLIN. *Manual para Antibiograma: Difusão em disco* (Kirby & Bauer). [S.l.], 2011.

Disponível em: <http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf>. Acesso em: 20 Dez 2012.

MACWHIRTER, P. Passerines. In: RITCHIE, W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, 1994. cap. 43, p. 1173-1198.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARINHO, M., BALDINE, S., SILVA, A. V., LISTONI, F. J. P., LANGONI, H. *Ação in vitro da enrofloxacin em microorganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-SP*. Ars Veterinaria, Jaboticabal, SP, Vol. 18, nº 2, 120-124, 2002.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard—Sixth Edition. Pennsylvania, USA, 2003.

PEREIRA, R.C.; ROQUE, F.O.; CONSTANTINO, P.A.L.; SABINO, J.; UEHARA-PRADO, M. Monitoramento in situ da biodiversidade: *Proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade*. Brasília/DF: ICMBio, 2013, 61p.

PILLAR, V. P.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. (Eds.). (2009). *Campos sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília: MMA, 403pp.

PORTO, M.L. 2002. *Os Campos Sulinos, sustentabilidade e manejo*. Ciência & Ambiente. 24:119-138.

SANCHES, T.C.; GODOY, S.N. Passeriformes (Canário, Sabiá, Pássaro-preto e Trincaferro). In: ZALMIR SILVINO CUBAS (Org.); JEAN CARLOS RAMOS SILVA (Org.); JOSÉ LUIZ CATÃO-DIAS (Org.). *Tratado de animais silvestres: Medicina Veterinária*. São Paulo: Editora Roca, 2014. p. 698-757.

SANTOS, H. F.; FLÔRES, M. L.; LARA, V. M.; SÁ, M. F.; BATTISTI, L. & LOVATO, L. T. *Microbiota cloacal de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos*. Pesquisa Veterinária Brasileira 30(12)1077-1082. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, 2010.

SERAFINI, P.P. (org.). 2014. *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho*. Série Espécies Ameaçadas, 31. 213p.

SILVA, A.C.S. *Avaliação da microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-amarelos (Gubernatrix cristata) vinculados ao programa de cativeiro da espécie*. 2016.

TGCI (Temperate Grasslands Conservation Initiative). 2008. *Life in a Working Landscape: Towards a Conservation Strategy for the World's Temperate Grasslands. A Record of The World Temperate Grasslands Conservation Initiative Workshop Hohhot, China – June 28 & 29, 2008*. TGCI/WCPA/ IUCN, Vancouver.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2012). *Microbiologia*. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed.