

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**CLÍNICA DE RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS –  
IMPORTÂNCIA NO ÂMBITO DA MEDICINA DA CONSERVAÇÃO**

Carla Patrícia Lopes Ferreira

Orientador

**Augusto Manuel Rodrigues Faustino**

Co-Orientador

**Ricardo Manuel Lemos Brandão**

Porto 2009

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**CLÍNICA DE RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS –  
IMPORTÂNCIA NO ÂMBITO DA MEDICINA DA CONSERVAÇÃO**

Carla Patrícia Lopes Ferreira

Orientador

**Augusto Manuel Rodrigues Faustino**

Co-Orientador

**Ricardo Manuel Lemos Brandão**

Porto 2009

## Resumo

---

O presente estágio desenvolveu-se no Centro de Ecologia, Recuperação e Vigilância de Animais Selvagens (CERVAS), em Gouveia, e teve como objectivo permitir o contacto com a clínica e medicina de recuperação de espécies selvagens autóctones, assim como a formação e sensibilização para a conservação de espécies protegidas. Durante o período de contacto, foi possível observar uma considerável variedade de animais, sobretudo aves, das quais uma grande proporção eram aves de rapina. Os principais procedimentos efectuados foram a recepção e estabilização dos pacientes, seguida de exame geral, diagnóstico e instituição de terapêutica, seguimento clínico e necrópsias. Durante a permanência no centro de recuperação, foi possível colaborar na monitorização da presença de hemoparasitas em aves selvagens ingressadas, tendo sido possível concluir que a presença deste tipo de parasitas é frequente nestes animais, sobretudo em aves de rapina, não se fazendo acompanhar de sinais clínicos característicos. Como complemento ao trabalho efectuado no CERVAS, também foi possível participar num projecto de investigação no Laboratório de Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), no qual se pesquisou a prevalência de bactérias comensais (*Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.) resistentes aos antimicrobianos em dejectos de animais selvagens. As amostras foram colhidas entre Março e Dezembro de 2008 e provieram de aves que deram entrada em dois centros de recuperação de fauna selvagem portugueses e também de exemplares de Lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*) de duas populações distintas e geograficamente separadas. Deste trabalho foi possível concluir que muitas resistências já estão instaladas nos habitats selvagens, provavelmente em consequência da contaminação ambiental de origem humana.

## Agradecimento

---

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração dos seguintes, a quem dirijo a minha sincera gratidão:

O meu orientador, **Dr. Augusto Faustino**, pela disponibilidade para me atender sempre que encontrei dificuldades e pelos esclarecimentos técnicos e científicos;

O **Dr. Ricardo Brandão**, o co-orientador deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança demonstrada, por oportunidades únicas, pela boa disposição e pela hospitalidade;

O **Dr. Paulo Martins da Costa**, pela oportunidade de integrar uma componente laboratorial neste trabalho e pelos esclarecimentos técnicos e científicos;

O **Dr. Francisco Álvares**, **Dr.<sup>a</sup> Sara Roque**, **Dr. Duarte Cadete**, **Dr.<sup>a</sup> Sara Pinto**, **Dr.<sup>a</sup> Helena Rio Maior**, **Dr.<sup>a</sup> Mónia Nakamura** e **Dr. Nuno Santos** pelo interesse, empenho e colaboração no projecto de pesquisa de antibiorresistências no Lobo-ibérico;

Os colegas com quem trabalhei dia-a-dia no CERVAS (**André**, **Andreia**, **Fátima**, **Helena**, **Zé**, **Liliana**, **Lúcia**, **Pedro**, **Samuel** e **Vítor**), pela amizade e pelos inúmeros esclarecimentos – porque, já dizia Abel Salazar, "*o médico que só sabe Medicina, nem Medicina sabe*";

Os meus amigos, que sempre manifestaram apoio e curiosidade por este trabalho, dando-me ânimo para continuar e fazer melhor;

Os meus pais, **Francisco** e **Gracinda**, pela coragem de me apoiarem mesmo quando discordaram das minhas opções – um Obrigado muito especial pela confiança...

Por fim, o **Dr. Valter Teixeira**, pela amizade incondicional e permanente acompanhamento deste trabalho, com sugestões construtivas e esclarecimentos científicos.

## Índice

---

1. Introdução .....	1
2. Desenvolvimento .....	3
2.1 Centro de Recuperação de Animais Selvagens .....	5
2.2 Actividade do Centro de Recuperação .....	7
3. Projectos de Monitorização de Populações Selvagens .....	13
3.1 Pesquisa de Hemoparasitas em Aves Selvagens .....	14
3.2 Pesquisa de Antibiorresistências na Flora Entérica de Animais Selvagens.....	18
4. Conclusão .....	29
5. Bibliografia.....	31
6. Anexos.....	35

## Índice de Figuras

---

Figura 1. Contenção de garça-real ( <i>Ardea cinerea</i> ) para avaliação clínica e exame de guardarrios ( <i>Alcedo atthis</i> ). .....	6
Figura 2. Exemplares de milhafre-preto ( <i>Milvus migrans</i> ), águia-calçada ( <i>Hieraaetus pennatus</i> ) e águia-de-asa-redonda ( <i>Buteo buteo</i> ) em câmaras de muda. ....	7
Figura 3. Acções de educação ambiental com crianças do ensino básico (Aguiar da Beira e Caramulo). ....	8
Figura 4. Garça-real ( <i>Ardea cinerea</i> ) e corujas-do-mato ( <i>Strix aluco</i> ) em câmara de muda com enriquecimento ambiental. ....	11
Figura 5. Abutre-preto ( <i>Aegypius monachus</i> ), grifos ( <i>Gyps fulvus</i> ) e bufo-real ( <i>Bubo bubo</i> ) em recuperação no CERVAS. ....	13
Figura 6. Gametócitos de <i>Leucocytozoon</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp. e forma mastigota de <i>Trypanosoma</i> spp. em sangue periférico de aves selvagens. ....	16
Figura 7. Características morfológicas de colónias de <i>E. coli</i> em meio TBX e <i>Enterococcus</i> spp. em meios SB e KAA quando observados à lupa. ....	25

## Índice de Gráficos

---

Gráfico 1. Número de ingressos no CERVAS, por ano.....	8
Gráfico 2. Evolução dos ingressos no CERVAS ao longo dos anos 2007 e 2008. ....	9
Gráfico 3. Ingressos no CERVAS em 2008, organizados por categoria.....	10
Gráfico 4. Proporção das oito espécies mais comuns que ingressaram em 2008. ....	10
Gráfico 5. Principais causas de ingresso dos animais que chegam ao CERVAS. ....	11
Gráfico 6. Preferências alimentares de duas subpopulações lupinas em Portugal. ....	22

## 1. Introdução

---

O presente estágio decorreu entre Outubro de 2008 e Janeiro de 2009, no Centro de Ecologia, Recuperação e Vigilância de Animais Selvagens (CERVAS), em Gouveia, enquadrado no Parque Natural da Serra da Estrela (PNSE). O objectivo principal foi ter contacto com a realidade de um centro de recuperação de animais selvagens, tendo oportunidade de conhecer melhor a fauna autóctone (sobretudo avifauna), assim como os principais procedimentos clínicos, operações de manutenção e o potencial destes centros para o desenvolvimento de projectos de investigação no âmbito da conservação da biodiversidade.

Os objectivos de um centro de recuperação de animais selvagens vão muito além do que o nome deixa transparecer. É verdade que a recuperação dos animais que são trazidos é uma importante parte do trabalho desenvolvido e uma grande motivação para aqueles que dedicam o seu tempo a um centro de recuperação, sendo eles Médicos Veterinários, estagiários ou voluntários. Contudo, há autores que argumentam que, apesar de importância de libertar os animais reabilitados (Negro *et al.* 2007), a recuperação do indivíduo tem um efeito questionável no todo da população (Donazar 1993, Anhauser & Woelfing 1985). Nesse sentido, é também da responsabilidade do centro de recuperação monitorizar a presença de problemas sanitários ao nível das populações selvagens (patologias ou de outra natureza) e prestar auxílio no controlo dos mesmos. A recepção de animais, mesmo que sejam apenas indivíduos de uma população mais ou menos numerosa, permite monitorizar algumas patologias emergentes, algumas com grande relevância em Saúde Pública e Medicina Veterinária, como é o caso da tuberculose ou da gripe aviária (WHO 2004). A educação ambiental é outra das vertentes em que um centro de recuperação actua, sendo essencial informar as populações sobre o trabalho que se desenvolve nestes locais e sobre os animais que são recuperados e a sua importância nos ecossistemas. Além do referido, o CERVAS em particular presta apoio a plataformas como o Programa Antídoto – no sentido de informar as populações sobre os perigos do uso indiscriminado de tóxicos e as consequências dos mesmos na biodiversidade – e também a vários projectos de investigação. Estes projectos abrangem áreas tão variadas como o treino de voo de aves antes da libertação, o enriquecimento ambiental das instalações do centro de recuperação, a construção e colocação de caixas-ninho, o seguimento das aves libertadas e a construção de uma base de dados especificamente adaptada às necessidades deste centro.

Neste sentido, este período de estágio no CERVAS possibilitou, além da aquisição de conhecimentos sobre identificação, manejo e clínica de animais selvagens, também a obtenção de um rico conhecimento sobre a biologia e ecologia de uma grande variedade de espécies da

fauna autóctone. Isto deveu-se ao espírito de equipa que existe neste centro de recuperação, onde colaboram diariamente médicos veterinários, biólogos, estagiários e voluntários, num salutar ambiente de companheirismo e partilha de conhecimentos.

Ao contrário do que seria de esperar para a época do ano em que decorreu o estágio, a afluência de novos animais ao centro de recuperação foi baixa, pelo que foi possível complementar este trabalho com a participação em dois projectos relacionados com a monitorização de populações selvagens, nomeadamente através da colheita sistemática de amostras de animais ingressados no Centro de Recuperação ou capturados no habitat natural.

O primeiro consistiu na pesquisa de hemoparasitas em esfregaços de sangue periférico de aves que ingressaram no CERVAS, numa tentativa de estimar a sua prevalência nas populações selvagens e relacionar o seu aparecimento com a condição clínica dos animais. Os géneros mais frequentemente encontrados foram *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* spp., sobretudo em aves de rapina, não se tendo encontrado sinais clínicos evidentes nos animais mais intensamente parasitados.

O segundo projecto envolveu a participação num trabalho de investigação a decorrer no Laboratório de Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Este trabalho consistiu na pesquisa de bactérias comensais, nomeadamente *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp., portadoras de resistência a antimicrobianos. As amostras consistiram em dejectos de aves selvagens e lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*). O objectivo deste trabalho foi avaliar em que medida a acção humana, nomeadamente ao nível da contaminação dos ecossistemas com antibióticos, se estende até ambientes que à partida não estão humanizados. Por outro lado, há que ter presente que existem espécies bacterianas que possuem resistência intrínseca a determinados antimicrobianos, não sendo o seu aparecimento uma consequência das actividades humanas (van den Bogaard *et al.* 2002, Martins da Costa *et al.* 2008, Barbosa & Levy 2000, Middleton & Ambrose 2005, Summers 2002). Foi possível confirmar a existência de um leque alargado de perfis de resistência, com um padrão característico consoante a origem dos animais (aves provenientes de um habitat selvagem ou cativeiro e lobos provenientes de duas populações distintas e separadas entre si).

Esta cooperação entre várias disciplinas – Saúde Pública, Saúde Animal e Conservação dos Ecossistemas – constitui o fundamento da Medicina de Conservação (Aguirre *et al.* 2002). Esta abordagem multidisciplinar é o futuro da abordagem à Saúde, tanto humana como animal, e também da prevenção da degradação ambiental.

## 2. Desenvolvimento

---

A presente secção abordará as várias áreas do trabalho desenvolvido numa perspectiva de integração, tendo como fio condutor o conceito de Medicina de Conservação, uma área interdisciplinar que abarca a Saúde Pública, Saúde Animal, Epidemiologia, Toxicologia, Ecologia e Biologia da Conservação (Aguirre *et al.* 2002). Esta dinâmica é essencial no trabalho de um Médico Veterinário, no sentido em que a Saúde Animal, nomeadamente ao nível dos animais domésticos, é indissociável da saúde humana e da saúde dos animais selvagens (Osofsy *et al.* 2000, WHO 2004). As zoonoses e as antropozoonoses são a prova real da relação íntima entre estas abordagens à Saúde (Deem *et al.* 2001).

As principais ameaças que as espécies selvagens enfrentam são a fragmentação dos habitats, a propagação de doenças infecciosas devido a alterações climáticas ou introdução de espécies exóticas (cuja acção negativa também se manifesta pela competição pelo alimento ou locais de abrigo), subnutrição e presença de tóxicos ou outro tipo de contaminação no ambiente. Estes factores combinam-se com o stress e a consanguinidade, acentuando a imunossupressão (Deem *et al.* 2001, Lafferty & Gerber 2002, Lanfranchi *et al.* 2003, Meffe 1999, Schloegel & Daszak 2004).

As doenças infecciosas são um desafio na conservação da fauna selvagem, o que justifica a necessidade de actuação do Médico Veterinário nesta área. Sendo a noção de doença nos animais um conceito muito vasto, Wobeser defende que deve ser definido tendo em conta o efeito na performance normal dos indivíduos. Desta forma, podemos caracterizar a doença como “qualquer limitação que interfere com as funções normais, incluindo respostas a factores ambientais como nutrição, tóxicos e clima; agentes infecciosos; anomalias congénitas ou uma combinação destes factores” (Wobeser 2006). Além das patologias, o declínio de muitas espécies da fauna autóctone está também relacionado com a acção humana, nomeadamente em consequência do aumento populacional, o que se reflecte na degradação e contaminação dos habitats, isolamento de populações e aumento da proximidade de estruturas humanas (tais como explorações pecuárias, parques eólicos ou auto-estradas) (Deem *et al.* 2001, Lemus *et al.* 2008).

Durante muito tempo, o papel do Médico Veterinário em conservação da fauna selvagem limitou-se ao tratamento de animais feridos, auxílio na imobilização e captura de animais selvagens em estudos de campo e também intervenção quando uma patologia infecciosa provocava elevada mortalidade. Esta intervenção é importante mas limitada, sendo desejável a sua participação na globalidade dos projectos de conservação, desde o planeamento até à execução no campo. Neste contexto, o Médico Veterinário possui valências que o tornam insubstituível na conservação de populações selvagens: capacidade de identificar

correctamente as causas de uma determinada patologia e as respectivas populações reservatório; capacidade de distinguir uma patologia que é relevante para a conservação de uma determinada espécie de outra que não produz efeito significativo na dinâmica das populações ou pode até funcionar como um factor de selecção; e ainda a competência para sugerir e planear estratégias de controlo de determinadas patologias (Lanfranchi *et al.* 2003).

Em acréscimo, as competências de um Médico Veterinário possibilitam-lhe uma visão global da Saúde que falta aos restantes profissionais desta área, como é o caso do domínio de conceitos como zoonose (uma doença transmitida dos animais vertebrados para o Homem), antropozoonose (uma doença originada no Homem e que pode ser transmitida aos animais) e espécie-reservatório (espécie na qual o agente patogénico sobrevive e se multiplica sem contudo provocar doença ou morte). Só uma capacidade de análise global e abrangente permite identificar e aplicar estes conceitos de forma correcta (Deem *et al.* 2001, Schloegel & Daszak 2004, WHO 2004).

Existem inúmeros exemplos de situações em que a acção humana gera alterações do equilíbrio dos ecossistemas, pondo em risco a Saúde Animal, assim como a Saúde Pública. Esta perspectiva atinge ainda maior relevância se se pensar que alguns animais selvagens são espécies cinegéticas que, após serem caçados, são trazidos para as povoações, onde é fácil existir contacto com os animais domésticos (Deem *et al.* 2001). Ao implantar explorações pecuárias perto de áreas habitadas por animais selvagens – que podem ser reservatórios de patologias às quais os animais domésticos são sensíveis – pode dar-se início a um fenómeno de amplificação com repercussões graves. São exemplos desta situação a tuberculose ou a gripe aviária (Schloegel & Daszak 2004). O inverso também acontece, estando documentados casos em que doenças de animais domésticos são introduzidas nas populações selvagens susceptíveis, causando declínios acentuados das mesmas. A Parvovirose Canina é uma patologia associada aos cães mas que tem sido responsável pelo declínio de populações de canídeos selvagens em todo o Mundo. Também a Brucelose, a Esgana, a Raiva e a Sarna Sarcóptica têm sido apontadas como originárias nos animais domésticos (Lafferty & Gerber 2002). Das doenças referidas acima, quase a totalidade são zoonoses (WHO 2004). Um outro exemplo são as alterações climáticas que se têm vindo a manifestar pelo aumento da temperatura média, o que interfere com a epidemiologia de certas doenças transmitidas por vectores, principalmente pela maior taxa de sobrevivência dos agentes patogénicos ou dos seus vectores durante o Inverno. A doença de Lyme e a Leishmaniose são exemplos claros de patologias que têm vindo a aumentar a sua prevalência e a expandir-se para além dos locais onde eram endémicos (Schloegel & Daszak 2004). O movimento global de pessoas e mercadorias, tanto numa perspectiva de turismo como de comércio Mundial, potencia a disseminação de doenças entre os diferentes continentes, de tal forma que qualquer patologia

emergente é capaz de se dispersar por áreas extensas de território (Lafferty & Gerber 2002, Weinhold 2003, Deem *et al.* 2001, WHO 2004).

A monitorização da presença de patologia nos animais selvagens é fundamental no controlo das zoonoses emergentes, na medida em que estas constituem uma ameaça à Saúde em todas as suas vertentes, assim como à economia Mundial. Esta vigilância pode ser feita mediante várias abordagens: através da reunião do máximo de informação e colheita de amostras nos animais que ingressam nos Centros de Recuperação, tendo assim uma ideia do que se passa nas populações de onde provêm; a colheita de amostras no campo, particularmente amostras fecais, de forma não invasiva, inclusivamente no contexto de actividades de caça; ou em concertação com outros estudos científicos em que seja essencial a captura dos animais, podendo assim obter dados acerca da dieta, factores de stress ou presença de agentes patogénicos nas populações estudadas (Weinhold 2003).

## 2.1 *Centro de Recuperação de Animais Selvagens*

---

Um Centro de Recuperação de Animais Selvagens é, sobretudo, um local onde são recebidos animais doentes, feridos ou debilitados e que tem a capacidade de lhes prestar cuidados veterinários.

Geralmente, os animais são encontrados por particulares posteriormente recolhidos e transportados até ao CERVAS pelas Equipas de Protecção da Natureza e Ambiente (EPNA) da Guarda Nacional Republicana. O transporte deve ser feito em caixas seguras e descartáveis (normalmente caixas de cartão), nas quais se fazem perfurações para permitir a ventilação (o ideal será que as perfurações se situem abaixo do nível dos olhos do animal). É importante assegurar que a caixa escolhida permita ao animal manter uma posição confortável, sem contudo permitir movimentos amplos ou causar lesões. Está contra-indicado o uso de palha ou erva dentro da caixa, uma vez que estas podem veicular microrganismos patogénicos ou provocar lesões nos animais, nomeadamente lesões oculares. Sendo assim, o uso de folhas de jornal é sempre preferível quando se deseja cobrir o fundo da caixa. O transporte deve ser feito de forma calma, mantendo a caixa imobilizada dentro do veículo e num local bem ventilado.

Quando chegam ao Centro de Recuperação, os animais são geralmente acompanhados de uma ficha onde constam a identificação e o contacto de quem os encontrou, assim como informações acerca do local onde se encontrava (proximidade de estradas, linhas eléctricas, terrenos agrícolas ou zonas de caça). Estas informações podem ser essenciais no estabelecimento do diagnóstico, uma vez que os sinais clínicos podem ser inespecíficos. O

tempo decorrido desde que o animal foi encontrado até à entrega também é uma informação útil, sobretudo no prognóstico.



**Figura 1.** Contenção de garça-real (*Ardea cinerea*) (à esquerda) para avaliação clínica e exame de guarda-rios (*Alcedo atthis*) (à direita).

De seguida, é feita a avaliação inicial do paciente, primeiro através de observação à distância e depois retirando o animal da caixa. Nesta fase, é importante observar o interior da mesma em busca de dejectos, egagrópilas, restos alimentares ou objectos estranhos, que podem também fornecer informação importante para o diagnóstico. Quando as lesões são incompatíveis com a posterior sobrevivência do animal no seu habitat natural – como é o caso das amputações de origem traumática – é ponderada a viabilidade do tratamento, sendo a eutanásia considerada uma opção humana. Posteriormente, avaliam-se também a condição corporal e o grau de desidratação, sendo de seguida calculado o volume de fluidos a administrar e a necessidade de suplementação com complexos vitamínicos. É feito o exame geral, de forma sistemática – bico ou focinho, narinas, membranas mucosas orais, dentes, olhos, ouvidos, pescoço, papo, tórax e abdómen, dorso, cloaca/ânus e genitais, cauda, uropígeo, membros anteriores e posteriores – evitando concentrar a atenção somente nas lesões óbvias. Todos os dados clínicos relevantes e tratamentos instituídos são imediatamente lançados numa base de dados digital, especialmente concebida para este centro de recuperação. Após o diagnóstico e terapia inicial, o animal é geralmente colocado no internamento, onde permanece enquanto o seu estado inspirar cuidados frequentes, tais como medicação, limpeza de feridas ou fisioterapia. Quando a sua condição física lhe permite voar, alimentar-se e procurar abrigo, é feita a transferência para as câmaras de muda, onde permanece durante o restante período de recuperação. Para as aves, a fase final corresponde ao treino de voo e musculação, durante a qual os animais são colocados no túnel de voo e estimulados diariamente a fazer exercício de preparação para a libertação.



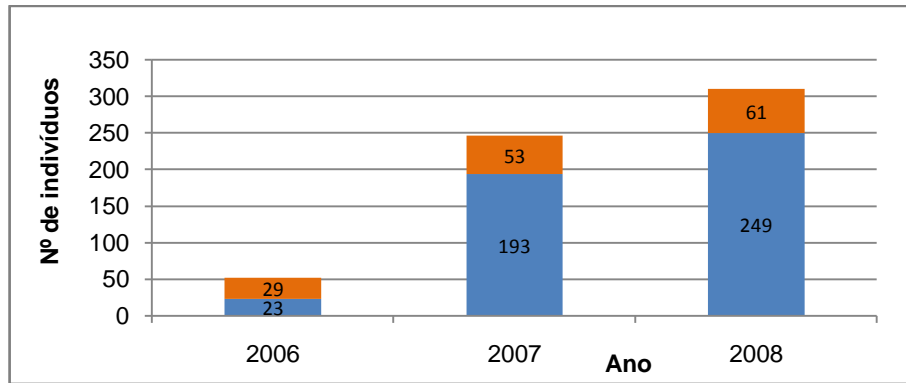
**Figura 2.** Exemplos de milhafre-preto (*Milvus migrans*) (à esquerda), águia-calçada (*Hieraaetus pennatus*) (ao centro) e águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) (à direita) em câmaras de muda.

Quando o estado do animal não permite a sua sobrevivência ou chega ao centro já morto, é encaminhado para necrópsia, sendo esta prática uma ferramenta importante ao dispor do Médico Veterinário. Independentemente da ordem utilizada, fundamental é que o exame seja sistemático, não descuidando qualquer pormenor e colhendo amostras de todos os tecidos cujo exame anatomopatológico, microbiológico ou toxicológico possa fornecer informações importantes acerca do processo patológico em causa (Latimer & Rakich 1993, Coles *et al.* 2007). Durante o período de estágio, foi possível colaborar na realização de 16 necrópsias, sobretudo de aves.

## 2.2 *Actividade do Centro de Recuperação*

---

Durante o período de estágio a que este texto se refere, o número de ingressos foi inexplicavelmente baixo quando comparado com igual período de 2007. Este acontecimento contraria a tendência que se tem observado, na qual todos os anos o número total de ingressos aumenta. O gráfico 1 mostra a tendência de aumento do número de ingressos observada desde o início da actividade do centro de recuperação, em Junho de 2006, até ao fim de 2008. O aumento do número de ingressos ao longo dos anos pode ser explicado pelo aumento do número de pessoas que conhecem o CERVAS e a maior sensibilização acerca dos procedimentos a adoptar quando se encontra um animal selvagem ferido ou doente.



**Gráfico 1.** Número de ingressos no CERVAS, por ano (azul - ingressos vivos; laranja – ingressos mortos).

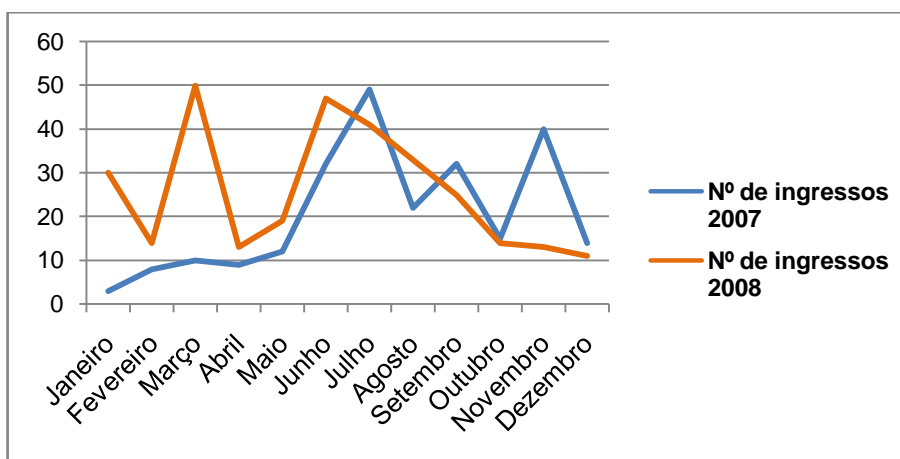
Esta maior informação deve-se sobretudo às acções de educação ambiental que têm sido desenvolvidas, sobretudo a participação em eventos regionais e a libertação pública de animais recuperados (Figura 1). Este tipo de acções é importante para um centro de recuperação por permitir informar as pessoas acerca da fauna selvagem – desmistificando algumas crenças acerca de determinadas espécies e que motivam a sua perseguição.



**Figura 3.** Acções de educação ambiental com crianças do ensino básico (Aguiar da Beira e Caramulo).

O gráfico 2 mostra a evolução dos ingressos no CERVAS, por mês, em 2007 e 2008. Os picos observados estão normalmente relacionados com períodos importantes na ecologia das espécies (nos meses de Verão observa-se um incremento dos ingressos devidos a queda do ninho, por ser nesta altura que as aves desse ano começam a tentar voar) ou períodos de maior perturbação antropogénica (épocas de caça). No mesmo gráfico pode observar-se que no período correspondente ao presente estágio se observou um decréscimo no número de ingressos, contrariamente ao que havia sucedido no ano anterior. Não é fácil justificar esta alteração, especialmente porque o número elevado de ingressos neste período se deve a ferimentos de tiro por caçadores. É somente possível especular que exista uma maior sensibilização dos mesmos ou um menor número de caçadores no campo, que justifique um menor número de animais abatidos.

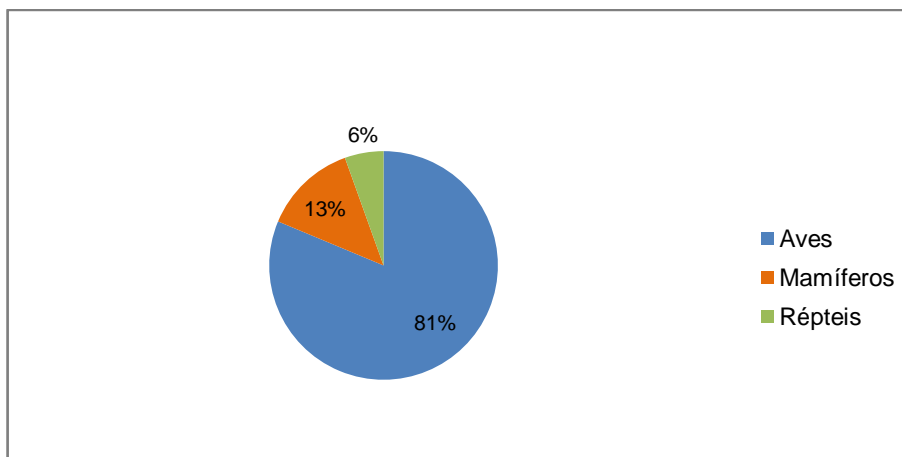
O reduzido número de novos casos nos meses de Outubro de 2008 a Janeiro de 2009 (este mês não incluído por não estar terminado aquando da elaboração do presente relatório) justificou a participação em outros projectos paralelamente ao trabalho do CERVAS, nomeadamente a pesquisa de hemoparasitas em sangue de aves e a pesquisa de bactérias antibiorresistentes em dejectos de animais selvagens. O desenvolvimento destes dois projectos será abordado mais adiante neste texto.



**Gráfico 2.** Evolução dos ingressos no CERVAS ao longo dos anos 2007 e 2008.

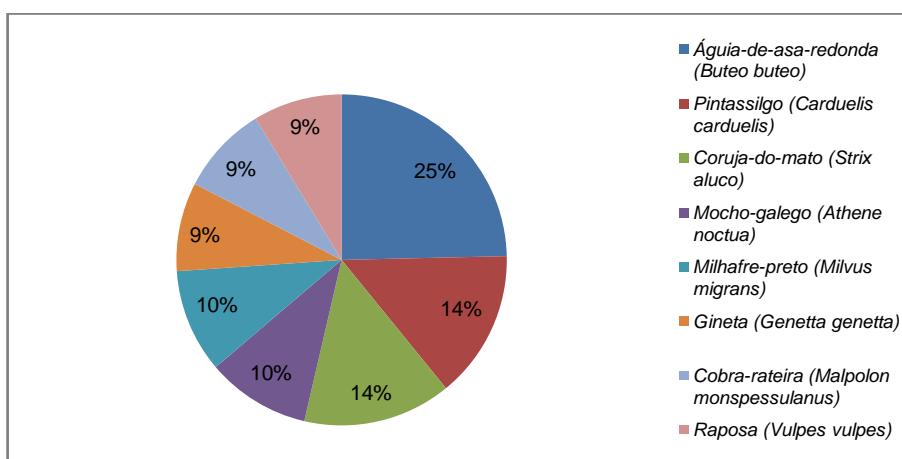
Existe uma grande variedade nos animais que chegam ao Centro de Recuperação, estando apenas excluídos os animais domésticos e as espécies cinegéticas. Sendo os animais selvagens caracterizados por hábitos discretos, são particularmente difíceis de detectar, mesmo quando estão doentes. Desta forma, muitos animais acabam por nunca ser transportados até ao Centro de Recuperação ou são transportados já depois de mortos. A proporção de animais mortos que ingressaram em 2008 foi de 20%. A importância destes não é de negligenciar, sendo a necrópsia uma ferramenta que nos permite aferir a causa de morte e conhecer o estado sanitário da fauna selvagem.

Se se repartir os animais por Classe taxonómica, a maior proporção é claramente de aves (81% em 2008), seguida dos mamíferos (13%) e, por fim, os répteis (6%) (Gráfico 3). Este predomínio das aves sobre as restantes classes pode dever-se ao facto de serem mais sujeitas a certo tipo de ameaças como o cativeiro ilegal ou a queda do ninho (neste caso, exclusiva das aves) do que as restantes.



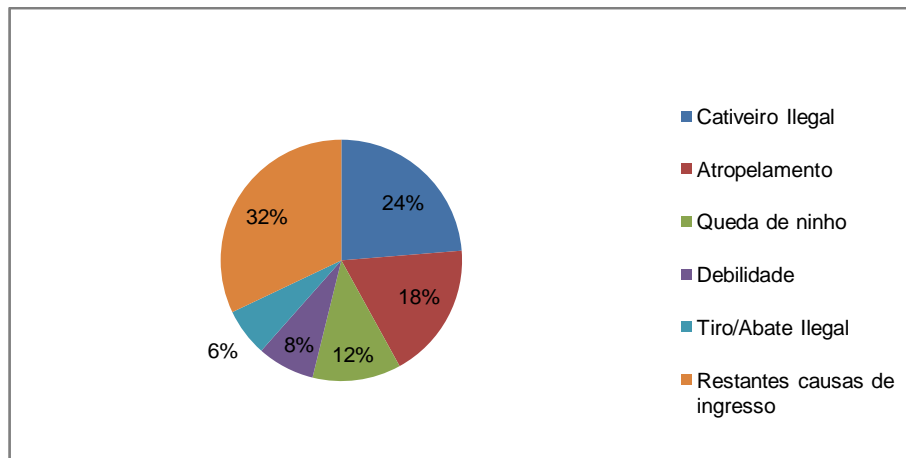
**Gráfico 3.** Ingressos no CERVAS em 2008, organizados por categoria.

Dentro das aves, existe ainda um predomínio das aves de rapina (ordens Falconiformes – rapinas diurnas – e Strigiformes – rapinas noturnas), o que pode estar relacionado com a biologia e ecologia das espécies. Tratando-se de aves carnívoras que, na sua maioria, precisam de caçar para obter alimento, estão sujeitas a ameaças relacionadas com essa actividade, nomeadamente o risco de colisão com estruturas ou atropelamento quando perseguem uma presa. Existe ainda uma grande percentagem de aves da ordem Passeriformes, que correspondem a pintassilgos (*Carduelis carduelis*) e outras aves canoras apreendidas devido a cativo ilegal. Estas aves são geralmente libertadas de imediato, pelo que a sua relevância no trabalho do Centro de Recuperação é menor.



**Gráfico 4.** Proporção das oito espécies mais comuns que ingressaram em 2008.

As causas de ingresso mais frequentes em 2008 estão representadas no Gráfico 5.



**Gráfico 5.** Principais causas de ingresso dos animais que chegam ao CERVAS.

O cativeiro ilegal é uma das principais ameaças para os animais selvagens, sobretudo aves. Estes animais chegam até nós frequentemente após terem sido apreendidos pelas autoridades, nomeadamente as EPNA. Uma grande proporção desses animais é capturada quando ainda são muito jovens, não tendo havido tempo para completarem a aprendizagem de sobrevivência no seu habitat, que normalmente fica a cargo dos progenitores. Sendo assim, a recuperação destes animais constitui um desafio acrescentado. Para estes – e para os restantes animais que tenham de permanecer muito tempo no Centro de Recuperação – torna-se necessário conceber estratégias que permitam ao animal em recuperação desenvolver as capacidades essenciais para a sua sobrevivência, nomeadamente habilidade para caçar e procurar abrigo. Neste sentido, o enriquecimento ambiental é uma das prioridades do CERVAS, sendo implementado ao nível das instalações e da alimentação.



**Figura 4.** Garça-real (*Ardea cinerea*) (à esquerda) e corujas-do-mato (*Strix aluco*) (à direita) em câmara de muda com enriquecimento ambiental.

Os programas consistem na projecção e construção de estruturas – poleiros, abrigos, lagos – que mimetizam o habitat natural da espécie, estimulando assim o desenvolvimento de comportamentos adequados ao habitat em causa e reduzindo o stress inerente à permanência no Centro de Recuperação. Em acréscimo a esta modificação ambiental, também a alimentação é sujeita a melhoramentos, sendo os animais colocados em programas de alimentação progressivamente mais complexos (inicialmente pedaços de carne desmanchada, depois carne envolta em pêlo, pedaços de carne escondidos, e por fim presas vivas), estimulando assim o instinto de caça. Os pesos dos animais e respectiva condição física são monitorizados frequentemente para avaliar o progresso dos programas (Gaibani & Csermely 2007).

A queda do ninho é frequente quando as aves fazem as primeiras tentativas de voo, contudo os progenitores podem continuar a alimentar as crias no chão. Quando estas aves são trazidas para o Centro de Recuperação exigem cuidados muito frequentes e podem beneficiar das estratégias de enriquecimento ambiental, no sentido de evitar a domesticação e facilitar o regresso ao habitat selvagem.

O tiro e o envenenamento são duas causas de ingresso que têm a sua origem na interacção entre o Homem e a Fauna Selvagem, que por vezes gera situações de conflito. Para contrariar estas situações, é essencial o desenvolvimento de acções e educação ambiental, com o objectivo de informar as populações acerca do papel dos animais selvagens nos ecossistemas e da sua importância no equilíbrio dos mesmos. Muitas das situações de conflito são fundamentadas em crenças, sendo essencial desmistificá-las e dar exemplos concretos de benefícios obtidos a partir destes animais (como, por exemplo, o controlo de roedores pelas aves de rapina).

Ao contrário do tiro, que geralmente afecta pequenos números de animais, o envenenamento constitui um problema que pode ter consequências graves em populações inteiras. O uso de venenos é uma técnica inespecífica de controlo de predadores, uma vez que não selecciona uma espécie-alvo, podendo os iscos ser ingeridos por qualquer animal (e depois outros animais ingerirem os primeiros, amplificando o fenómeno). No caso particular de espécies gregárias como os grifos (*Gyps fulvus*), que se alimentam em conjunto, uma única carcaça envenenada pode determinar o extermínio de toda uma colónia.



**Figura 5.** Abutre-preto (*Aegypius monachus*) (à esquerda), grifos (*Gyps fulvus*) (ao centro) e bufo-real (*Bubo bubo*) (à direita) em recuperação no CERVAS.

Muitas aves chegam aos Centros de Recuperação com lesões de origem traumática, apresentando fracturas ósseas, sobretudo nas asas (e em menor número nos membros posteriores). Uma vez que o CERVAS ainda não possui equipamento de anestesia volátil, torna-se impossível resolver os casos em que a cirurgia é a única alternativa – estas aves são encaminhadas para o Centro de Recepção, Acolhimento e Tratamento de Animais Selvagens (CRATAS) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

### 3. Projectos de Monitorização de Populações Selvagens

---

Além dos projectos que se encontram em curso no CERVAS com o objectivo de monitorizar a viabilidade e sobrevivência dos animais libertados, surgiu também a hipótese de integrar no presente estágio a participação em duas iniciativas com uma finalidade semelhante, contudo numa perspectiva da Medicina Veterinária. Estes projectos consistiram na pesquisa de hemoparasitas em amostras sanguíneas de aves ingressadas no CERVAS e também na caracterização da prevalência de antibiorresistências em bactérias fecais isoladas a partir de animais selvagens, sendo a amostra deste segundo projecto constituída por aves ingressadas no CERVAS e também exemplares de lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*).

Entre as aves que integraram a amostra em estudo, contam-se espécies com estatutos muito distintos em termos de conservação. As espécies mais comuns correspondem, compreensivelmente, às que têm maior número de ingressos no Centro de Recuperação, nomeadamente a Águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*), a Coruja-do-mato (*Strix aluco*), o Mocho-galego (*Athene noctua*) ou o Milhafre-preto (*Milvus migrans*). Contudo, existem também amostras de indivíduos pertencentes a espécies consideradas “criticamente em perigo”, como é o caso do Abutre-preto (*Aegypius monachus*), cuja população nacional não ultrapassa os 6 indivíduos adultos maturos; ou “em perigo”, como a Águia de Bonelli (*Hieraaetus fasciatus*), cuja população em Portugal está entre os 50 e os 250 indivíduos adultos (ICN 2005).

### 3.1 Pesquisa de Hemoparasitas em Aves Selvagens

---

**Introdução.** Os hemoparasitas mais comuns em aves selvagens são *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp., ambos parasitas veiculados por insectos, nomeadamente moscas. *Plasmodium* spp. e *Trypanosoma* spp. também podem ser observados, mas com menor frequência. Os sinais clínicos surgem raramente, estando associados a estados de imunossupressão, e são sobretudo anemia, edema pulmonar e hepatoesplenomegalia, principalmente em infecção simultânea por *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. (Greiner & Ritchie 1993, Campbell & Ellis 2007).

*Haemoproteus* spp. é um parasita intracelular dos eritrócitos que afecta várias espécies de aves e é caracterizado por baixa patogenicidade. É possível observar animais aparentemente saudáveis com elevado grau de parasitismo, sobretudo rapinas nocturnas (Ordem Strigiformes). A transmissão é feita através da picada de moscas do género *Culicoides*, que ingerem os gametócitos quando se alimentam de animais infectados e posteriormente inoculam os esporozoítos num hospedeiro sensível. Os esporozoítos invadem os tecidos do hospedeiro e sofrem esquizogonia, originando esquizontes que por sua vez produzem merozoítos. Os merozoítos alcançam a corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, onde podem ser observados sob a forma de gametócito. Podem ser detectados pela aparência em forma de anel que circunda o núcleo sem contudo o deslocar do centro da célula e pela presença de grânulos amarelados. Os sinais de parasitemia são inespecíficos, nomeadamente anemia hemolítica, anorexia e depressão (Coles *et al.* 2007, Campbell & Ellis 2007).

*Leucocytozoon* spp. é um parasita intracelular de eritrócitos e leucócitos que pode afectar várias espécies de aves com gravidade variável, sendo geralmente pouco patogénico em rapinas. O ciclo de vida também envolve vectores artrópodes, sobretudo moscas da família Simuliidae, que inoculam esporozoítos nos hospedeiros definitivos. A esquizogonia ocorre sobretudo no fígado, originando merozoítos que alcançam a corrente sanguínea e invadem os eritrócitos (e possivelmente leucócitos). No esfregaço sanguíneo podem ser vistos como gametócitos, estruturas basófilas ou eosinófilas de grandes dimensões que deformam a estrutura celular e comprimem o núcleo na periferia da célula. É comum as células adquirirem uma morfologia fusiforme com núcleo de cor púrpura escuro e grânulos refringentes avermelhados. Os sinais clínicos são raros, mas quando ocorrem caracterizam-se por anemia hemolítica e anorexia que pode ser fatal (Coles *et al.* 2007, Campbell & Ellis 2007).

*Plasmodium* spp. é o agente da malária e são conhecidas pelo menos vinte e cinco espécies. Os vectores são mosquitos *Culicine* spp. e existe uma grande variação de susceptibilidade das diferentes espécies de aves à patologia, sendo algumas aves altamente susceptíveis (como é o caso das rapinas) e outras aparentemente assintomáticas, podendo até

funcionar como reservatórios do parasita (o exemplo são algumas espécies de Passeriformes). O ciclo de vida deste parasita é muito semelhante ao de *Haemoproteus* spp., ressalvando-se apenas que a esquizogonia ocorre nos eritrócitos. A detecção no esfregaço sanguíneo passa pela identificação de estruturas intracelulares nos eritrócitos e leucócitos que geralmente deformam a estrutura normal da célula ao empurrar o núcleo para a periferia. Os sinais clínicos associados a esta patologia são anemia hemolítica, anorexia, depressão, dispneia, presença de fezes verde brilhante (devido ao aumento da biliverdina) ou morte súbita (Coles *et al.* 2007, Campbell & Ellis 2007).

*Trypanosoma* spp. é um parasita encontrado com menos frequência e cuja patogenicidade é baixa. Os vectores podem ser mosquitos, moscas ou ácaros. Este parasita é facilmente identificado no esfregaço sanguíneo pela presença de uma membrana ondulada, uma extremidade posterior afilada e um curto flagelo orientado anteriormente (Campbell & Ellis 2007).

**Material e métodos.** No período compreendido entre Outubro de 2008 e Janeiro de 2009 foram observados 113 esfregaços sanguíneos provenientes de 65 aves que deram entrada no CERVAS. Os esfregaços foram obtidos a partir de aves de 20 espécies diferentes, principalmente aquando da entrada no Centro de Recuperação (ver Anexo I, tabela 1).

O sangue foi colhido através de punção da veia basílica, utilizando-se para o efeito agulhas de 23G ou 25G e seringas de 1 mL ou 2 mL. Os esfregaços resultantes (geralmente dois por ave) foram identificados com o nome científico da espécie, número de identificação do animal e data da colheita e seguidamente corados com Diff-Quik.

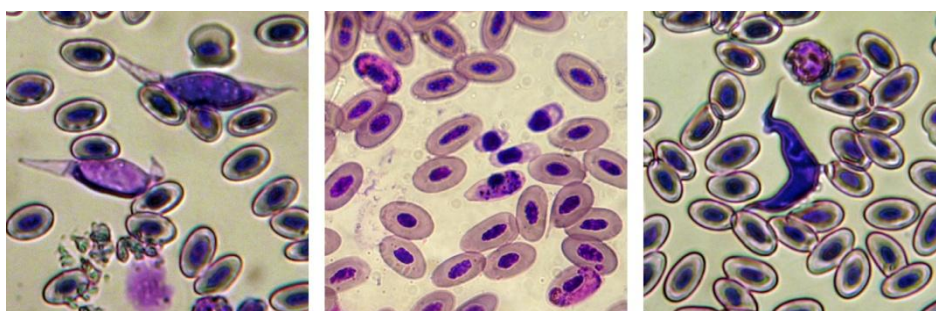
Os esfregaços foram observados ao microscópio em toda a sua extensão e foi estimado o número médio de cada tipo de parasita por campo de visão na ampliação de 1000x. Os resultados foram lançados numa base de dados onde constam a data de realização do esfregaço, o número de identificação do animal e respectivo nome científico da espécie em causa, seguido da presença ou ausência de parasitas e, se presentes, a estimativa do número como referido anteriormente.

O tratamento estatístico dos dados foi feito recorrendo ao software SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 16.0.

**Resultados.** As observações estão resumidas no ver Anexo I – tabelas 2, 3 e 4. Foi possível observar parasitas dos géneros *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp. e *Trypanosoma* spp. (Figura 3). A percentagem de amostras com parasitas, independentemente do tipo, foi de 24,8% ( $n = 28$ ). Separando as aves da amostra por Ordem taxonómica, as mais parasitadas foram as rapinas nocturnas (Strigiformes), com 40% de amostras positivas ( $n =$

12), seguidos das rapinas diurnas (Falconiformes), com 26,2% de amostras com parasitas ( $n = 16$ ) (ver Anexo I, tabela 5). Dentro de cada uma destas ordens, as espécies mais parasitadas foram a Águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) e o Mocho-galego (*Athene noctua*). As restantes ordens, Ciconiiformes e Passeriformes, não apresentaram qualquer resultado positivo. O tipo de infestação mais comum foi por *Leucocytozoon* spp. (23% do total dos esfregaços,  $n = 26$ ), seguido de *Haemoproteus* spp. e *Trypanosoma* spp. (cada um com 2,7% do total de esfregaços,  $n = 3$ ), o que se assemelha aos resultados anteriores obtidos por Merino *et al.* (1997) e Tomé *et al.* (2005). Existiam também casos de infecções com mais do que um tipo de parasita (1 esfregaço com *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. numa rapina diurna e 3 esfregaços com *Leucocytozoon* spp. e *Trypanosoma* spp., todos em rapinas nocturnas).

No que respeita a densidade de parasitismo, *Leucocytozoon* spp. foi detectado sobretudo em rapinas nocturnas (40%,  $n = 12$ ), seguido das rapinas diurnas (23%,  $n = 14$ ). Em 53,8% ( $n = 14$ ) dos esfregaços, encontrava-se menos de 1 parasita por campo de 1000x; em 19,2% ( $n = 5$ ) encontrou-se 1 parasita e em 27% ( $n = 7$ ) encontraram-se 2 ou mais. No caso de *Haemoproteus* spp., todas as amostras positivas provieram de rapinas diurnas (4,9% de infestação dentro da Ordem,  $n = 3$ ). Em 2 amostras foram observados 2 parasitas por campo de 1000x e em apenas 1 foram observados 3 parasitas por campo de ampliação. O parasita *Trypanosoma* spp. somente foi detectado em amostras de aves de rapina nocturnas (10% de infestação dentro da Ordem,  $n = 3$ ). Em todas as amostras a densidade por campo de 1000x foi menor que 1 parasita (ver Anexo I, tabela 6).



**Figura 6.** Gametócitos de *Leucocytozoon* spp. (à esquerda) e *Haemoproteus* spp. (ao centro) e forma mastigota de *Trypanosoma* spp. (à direita) em sangue periférico de aves selvagens.

**Discussão.** Segundo estes resultados, a percentagem de infecção por hemoparasitas foi bastante elevada, o que poderia levar a concluir que este tipo de agentes constitui uma ameaça à sobrevivência dos indivíduos. Contudo, a maior parte dos animais dos quais provieram estas amostras apresentavam-se assintomáticos, tendo alguns inclusivamente sido declarados prontos para libertação. Esta observação vai ao encontro de vários autores que

consideram os hemoparasitas agentes de baixa patogenicidade e cuja identificação não constitui um mau prognóstico na recuperação dos animais selvagens (Greiner & Ritchie 1993, Coles *et al.* 2007, Campbell & Ellis 2007).

O facto de as espécies mais parasitadas serem a águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) e o mocho-galego (*Athene noctua*) pode ter duas explicações possíveis. Em primeiro lugar, o facto de estas duas espécies estarem em maior número na amostra analisada pode constituir um factor de viés. Por outro lado, a epidemiologia destas infecções está dependente da ecologia dos vectores, maioritariamente moscas e mosquitos. O ciclo de vida da maior parte destes artrópodes está dependente do clima, precipitação e topografia – uma vez que apresentam fases do desenvolvimento em que são aquáticos. Sendo assim, é compreensível que os vectores sejam mais abundantes em regiões florestais húmidas ou campos agrícolas, o habitat preferencial destas espécies de aves na região em estudo (Centro) (Tomé *et al.* 2005).

Conforme já havia sido observado anteriormente, não foi possível encontrar hemoparasitas em abutres. Blanco *et al.* (1998) examinaram esfregaços sanguíneos de grifos (*Gyps fulvus*) em Espanha, não tendo encontrado evidências de hemoparasitas em nenhuma das 82 amostras estudadas. A justificação apresentada por estes autores vai de encontro ao que foi referido anteriormente, uma vez que os habitats explorados por estas aves são sobretudo zonas escarpadas e com ventos fortes, o que dificulta o acesso por parte dos vectores. A presença de um sistema imune extraordinariamente desenvolvido – característico de animais que se alimentam de cadáveres em decomposição – também pode estar relacionada com estas observações (Blanco *et al.* 1998).

Dado que não se observaram sinais clínicos relacionados com a parasitémia – anemia hemolítica, anorexia, dispneia e depressão sem outra causa – e permanece desconhecido o papel dos hemoparasitas no desenvolvimento de doença nestas aves, não foram efectuados tratamentos farmacológicos no sentido de os eliminar antes da libertação.

### 3.2 Pesquisa de Antibiorresistências na Flora Entérica de Animais Selvagens

---

**Introdução.** O uso recorrente de antibióticos nas espécies domésticas e a sua relação com o desenvolvimento de resistências por parte dos microrganismos é um tema pertinente e largamente discutido na actualidade (Acar & Röstel 2001, van den Bogaard *et al.* 2002, Angulo *et al.* 2004, Martins da Costa *et al.* 2008, Lemus *et al.* 2008).

Inicialmente, a resistência aos antimicrobianos surgiu como um mecanismo de auto-defesa dos próprios organismos produtores destas substâncias. Os determinantes dessa resistência podem ter sido transferidos para outros organismos, num fenómeno de amplificação cuja força motriz foi a intensificação do uso de antibióticos na Medicina moderna e também em Medicina Veterinária, sobretudo nas espécies pecuárias (Barbosa & Levy 2000, Acar & Röstel 2001, Angulo *et al.* 2004, Martins da Costa *et al.* 2008).

O longo de vários anos observou-se que, após a introdução de um novo antimicrobiano, surgiam rapidamente estirpes resistentes ao mesmo. Tendo em conta a teoria de que os microrganismos em causa não teriam vantagem competitiva perante a restante flora na ausência do antimicrobiano foi, então, determinada a cessação da utilização de alguns deles, na expectativa de que a diminuição da pressão selectiva revertesse a resistência. Tal não foi observado, pelo menos em magnitude comparável com a emergência das resistências – em parte em virtude de as bactérias terem sido capazes de estabilizar a resistência no seu genoma (Middleton & Ambrose 2005). Isto acontece porque, na realidade, os genes e mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos estão frequentemente associados à defesa contra outros factores de stress, nomeadamente desinfectantes, variações de pH ou metais pesados. Este fenómeno fornece justificação para a manutenção da resistência na ausência de pressão selectiva pelo antimicrobiano – uma vez que a sua expressão pode ser precipitada por outros factores ambientais – e também para o facto de ser possível encontrar bactérias com resistência a múltiplos compostos e com factores de virulência acrescidos, uma vez que todas estas características podem estar condensadas num mesmo segmento de ADN (ácido desoxirribonucleico) (Barbosa & Levy 2000, Summers 2002, Bonnet 2004). Existem evidências da existência de genes que codificam simultaneamente para a resistência a desinfectantes, aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, trimetoprim, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol (Fluit *et al.* 2001).

A presença de concentrações subterapêuticas de antibióticos no aparelho digestivo dos animais tem um efeito selectivo, ao eliminar a flora competitiva sensível ao antimicrobiano, sendo este efeito ainda mais intenso quando se trata de um antibiótico de largo espectro (Acar

& Röstel 2001, Blanco *et al.* 2006, Lemus *et al.* 2008). Em Medicina Veterinária, muitos antimicrobianos são usados com finalidade profilática (por exemplo, coccidiostáticos), sendo a sua administração feita na água ou alimento nas explorações pecuárias (McEwen & Fedorka-Cray 2002, van den Bogaard *et al.* 2002, Martins da Costa *et al.* 2008). Nestas situações, a dose administrada é difícil de controlar e invariavelmente subterapêutica. Apesar da obrigatoriedade de se observar um período de espera – Intervalo de Segurança – entre a última administração do fármaco e o abate ou recolha de ovos e leite (no sentido de minimizar os resíduos presentes), a contaminação ambiental gerada através dos efluentes sólidos e líquidos pode contribuir significativamente para a manutenção e aparecimento de antibiorresistências. Da mesma forma, o uso de substâncias com acção antimicrobiana na agricultura introduz concentrações subterapêuticas de antibióticos nos solos e meios aquáticos, resultando na selecção de estirpes resistentes num grande número de habitats, influenciando todos os seres vivos que dele dependem (Barbosa & Levy 2000, Summers 2002, Dancer 2004).

A maior parte dos microrganismos portadores de determinantes de resistência não são patogénicos, contudo a sua emergência em animais imunodeprimidos ou a coabitação – por exemplo, no tracto gastrointestinal – com outras bactérias de maior potencial patogénico pode constituir uma ameaça à sobrevivência devido ao potencial de partilha genética entre elas (Barbosa & Levy 2000, Fluit *et al.* 2001, McEwen & Fedorka-Cray 2002, Dancer 2004, Middleton & Ambrose 2005, Martins da Costa *et al.* 2008). Os mecanismos de resistência mais comuns incluem inactivação do antibiótico por acção enzimática, diminuição da permeabilidade celular, expulsão activa do antibiótico e modificação das moléculas alvo destas substâncias. No anexo II, a tabela 7 sumaria os mecanismos de acção dos antibióticos testados e respectivos mecanismos de resistência.

As bactérias podem possuir naturalmente determinantes de resistência ou podem adquiri-los de várias formas: mutações espontâneas de genes que codificam os alvos do antibiótico ou partilha de genes com outras bactérias por transdução (mediada por bacteriófagos) ou conjugação (mediante o contacto directo de duas células, resultando na partilha de ADN sob a forma de plasmídeos ou transposões) (Barbosa & Levy 2000, Middleton & Ambrose 2005, Sjölund *et al.* 2008). No caso das mutações, apesar de serem eventos raros, é possível observar os efeitos da resistência rapidamente, enquanto que na transmissão horizontal entre bactérias, podem decorrer meses sem se produzirem efeitos detectáveis (Acar & Röstel 2001).

Os microrganismos seleccionados para o presente estudo são bactérias comensais do aparelho digestivo do Homem e de outros animais, nomeadamente *Escherichia coli* e várias espécies do género *Enterococcus*, principalmente *E. faecalis* e *E. faecium*. A importância da

presença de antibioresistência nestes microrganismos prende-se com o seu papel enquanto reservatórios de determinantes de resistência e a sua ubiquidade (McEwen & Fedorka-Cray 2002, Sjölund *et al.* 2008).

No caso de *Enterococcus* spp., bactérias Gram positivas abundantes na flora intestinal, dotados de uma elevada capacidade de resistência no ambiente, estando portanto presente nos solos, águas e alimentos (Martins da Costa *et al.* 2006). Neste género, a resistência à vancomicina, um glicopéptido usado como último recurso em infecções hospitalares, pode estar ligada ao uso de outro glicopéptido – a avoparcina – em espécies pecuárias como promotor de crescimento. A avoparcina selecciona a favor da aquisição o gene *vanA*, que confere simultaneamente resistência à vancomicina e à teicoplanina, outro glicopéptido (van der Bogaard *et al.* 2002). O uso da avoparcina foi banido na União Europeia em 1997, contudo a disseminação de bactérias resistentes a partir de populações pecuárias estava já estabelecida, tendo ocorrido sobretudo através da ingestão de carnes contaminadas (Angulo *et al.* 2004). Este fenómeno realça um ponto importante e que se enquadra na visão global sugerida pela Medicina da Conservação: a sobreposição existente entre os antimicrobianos usados em Medicina e em Medicina Veterinária possibilita a emergência de estirpes de microrganismos resistentes cujos efeitos nefastos se podem disseminar globalmente. Esta situação conhece ainda maior magnitude quando se consideram as migrações de muitas espécies de aves e o trânsito mundial de pessoas, animais e produtos alimentares, transportando consigo resíduos destes compostos e bactérias resistentes aos mesmos (Moulin *et al.* 2008).

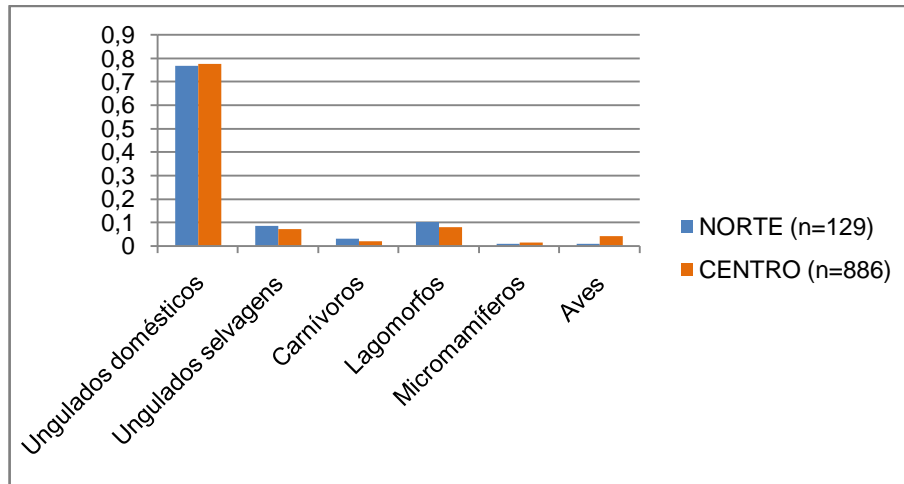
No caso de *E. coli*, bactéria Gram negativa, a ecorresistência é menor, sendo menos frequente o seu isolamento em amostras expostas a baixas temperaturas ou armazenadas durante um maior período de tempo (Middleton & Ambrose 2005). A presença de *E. coli* resistente aos antimicrobianos, nomeadamente estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL) em animais selvagens já tinha sido descrita anteriormente (Costa *et al.* 2006, Costa *et al.* 2008). A produção de ESBL em Enterobacteriaceae tem sido associada com a resistência a cefalosporinas de largo espectro de acção, estando vários fenótipos diferentes já descritos (expressão de  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV e, mais recentemente, CTX-M). Destas, as da família CTX-M são as mais recentes, tendo a sua expansão motivado vários estudos. A principal distinção fenotípica entre esta e as famílias TEM e SHV tem a ver com uma maior taxa de resistência à cefotaxima no caso das CTX-M e à ceftazidima no caso de TEM e SHV. Também está descrita menor actividade contra penicilinas e maior susceptibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases (ácido clavulânico e tazobactam) no caso das CTX-M (Crowley & Ratcliffe 2003, Edelstein *et al.* 2003, Pitout *et al.* 2003, Bonnet 2004, Livermore *et al.* 2007, Galas *et al.* 2008). Além destas, também as  $\beta$ -lactamases da família

AmpC têm sido descritas em infecções hospitalares, e geralmente conferem resistência à ampicilina e a cefalosporinas de amplo espectro, como é o caso da cefoxitina (Mulvey *et al.* 2005).

O trabalho desenvolvido teve como objectivo avaliar até que ponto a contaminação dos ecossistemas com resíduos de antibióticos e bactérias resistentes aos mesmos poderá estar a estender-se até habitats escassamente humanizados, como é o caso daqueles ocupados pelas espécies selvagens em estudo. Estudos anteriores já o tinham observado, nomeadamente em aves do Ártico (Sjölund *et al.* 2008) e em várias espécies de animais selvagens em Portugal (Costa *et al.* 2008), contudo ainda não existia qualquer estudo comparativo em termos geográficos nem resultados em lobos selvagens. As amostras estudadas provieram de aves que ingressaram em dois centros de recuperação de animais selvagens – o CERVAS e o Centro de Recuperação do Parque Nacional da Peneda-Gerês (PNPG) – e de lobos de duas subpopulações em Portugal (uma na região norte do rio Douro e outra a sul do mesmo rio).

O lobo é o maior canídeo selvagem do Mundo, com uma distribuição que se estende pela Ásia, América do Norte e Europa, sobretudo Oriental. Após séculos de declínio populacional por toda a Europa, parecem existir evidências de que a espécie começou lentamente a recuperar (Mech & Boitani 2003), sem no entanto essa tendência se estender à Península Ibérica. Os principais factores responsáveis pelo declínio desta espécie têm sido a perseguição humana (envenenamento, abate ilegal, atropelamento), a escassez de presas adequadas e a fragmentação do habitat devido à expansão da área humanizada, com terrenos agrícolas, barragens e auto-estradas (ICN 2005). O efectivo que ocorre em Portugal corresponde a uma subespécie endémica da Península Ibérica – o lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*), cuja população se subdivide em duas subpopulações. A mais numerosa (entre 45 e 55 alcateias) encontra-se a norte do rio Douro, e tem contacto com a população espanhola; e uma outra a sul do mesmo rio, aparentemente isolada da restante população ibérica e que não ultrapassa as 10 alcateias. A população portuguesa total está estimada entre os 200 e os 400 indivíduos (ICN 2005).

Os ungulados silvestres – as presas naturais do lobo – apresentaram também um declínio populacional, sobretudo devido ao avanço das áreas humanizadas e à criação de gado em regime extensivo. Sendo assim, também os hábitos alimentares das populações lupinas sofreram alterações, tendo-se estas adaptado à facilidade de obtenção de alimento proporcionada pelas pecuárias extensivas ou intensivas. Estudos realizados nas duas áreas populacionais mais relevantes revelaram que as espécies domésticas estão no topo das preferências de consumo das duas subpopulações em estudo (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Preferências alimentares de duas subpopulações lupinas em Portugal.

Como se pode verificar, a maior proporção de alimento consumido corresponde a ungulados domésticos – 76,8% no Norte (Roque *et al.* 2001) e 77,6 a 82% na região sul do Douro (Grilo *et al.* 2002, Roque *et al.* 2005) – seguido dos lagomorfos (coelho e lebre) – equivalente a 10% no Norte e 8% da dieta no Sul – e só depois os ungulados silvestres (sobretudo javali e corço) – com 8,6 % do total no Norte e 3 a 7,1% no Sul. Uma característica distintiva entre as duas subpopulações prende-se com o consumo de aves – apenas 0,8% da dieta no norte do Douro e 3 a 4% na região a sul do rio (Roque *et al.* 2001, Grilo *et al.* 2002, Roque *et al.* 2005). Esta tendência pode dever-se à intensificação das aviculturas na região Centro do país, onde as aviculturas produzem uma grande quantidade de resíduos, sobretudo cadáveres, cujo acesso nem sempre está vedado.

O interesse em estudar duas populações isoladas e com hábitos alimentares distintos – maior recurso a animais criados em regime extensivo no Norte e intensivo no Sul – foi tentar perceber se diferentes níveis de pressão selectiva pelo uso de antibióticos originam diferentes padrões de antibiorresistência, como já havia sido descrito por outros autores (Costa *et al.* 2008).

Quando uma ave ou um lobo se alimentam à base de animais domésticos ou, no caso de aves não carnívoras, contaminados por resíduos provenientes dos mesmos, existem duas possibilidades para explicar a presença de bactérias comensais resistentes a antimicrobianos. A primeira explicação será a presença de resíduos desses fármacos em concentrações subterapêuticas durante um período mais ou menos alargado de tempo, que resulta na selecção da flora entérica do animal em causa, desenvolvendo-se sobretudo as estirpes resistentes. A outra hipótese passa pela ingestão de conteúdo gastrointestinal das presas (cuja flora estará previamente seleccionada pelo uso de antibióticos), havendo posterior partilha de informação genética. As bactérias ingeridas, apesar de não serem capazes de colonizar o intestino de espécies diferentes, têm contudo um tempo de passagem mais ou menos longo

pelo aparelho gastrointestinal do animal, podendo haver transmissão horizontal de determinantes de resistência.

**Material e métodos.** As amostras em estudo consistiram em material fecal de aves selvagens (16 amostras provenientes do Centro de recuperação do PNPG e 159 amostras do CERVAS) e de exemplares de lobo-ibérico (11 provenientes da zona norte do rio Douro e 10 provenientes da zona sul). A colheita de amostras em aves decorreu entre Março e Dezembro de 2008 e foi efectuada através da introdução de uma zaragatoa estéril na cloaca aquando do ingresso ou saída do Centro de Recuperação. No caso dos lobos, as amostras foram colhidas entre Outubro e Dezembro de 2008 e consistiram, sobretudo, em dejectos obtidos no contexto de dois projectos de estudo e conservação de lobo-ibérico. Estes são o Projecto de Investigação e Conservação do Lobo-ibérico no Noroeste de Portugal e o Plano de Monitorização do Lobo na área dos Projectos Eólicos das Serras de Montemuro, Freita, Arada e Leomil, ambos coordenados pelo Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO-UP).

As zaragatoas contendo material fecal foram introduzidas em tubos Falcon<sup>®</sup> de 10 mL, contendo 5 mL de meio *Buffered Peptone Water* (BPW) (Oxoid) e armazenados a 4 °C até análise laboratorial. Todos os tubos foram identificados com a referência do animal e data da colheita. Antes de iniciar o processamento, as amostras foram suplementadas com cefotaxima (CTX) (Sigma), com concentração final de 2 µg/mL, e vancomicina (V) (Oxoid), com concentração de 6 µg/mL, e deixadas à temperatura ambiente durante 2 horas. De seguida, procedeu-se à realização de sementeiras em meios *Hektoen enteric agar* (HEA) (Oxoid) e *Tryptone Bile X-glucuronide Agar* (TBX) (Biokar Diagnostics) suplementado com CTX (2 µg/mL), para o isolamento de *E. coli*, e *Slanetz and Bartley Agar* (SB) (Oxoid) e *Kanamycin Aesculin Azide agar* (KAA) (Oxoid), ambos suplementados com V (6 µg/mL), para o isolamento de *Enterococcus* spp. As placas de HEA foram semeadas por esgotamento e as restantes por espalhamento. Após 12 a 16 horas de enriquecimento, foram semeadas novas placas, todas pela técnica de esgotamento.

Todas as placas foram incubadas a 37 °C, tendo sido avaliadas ao fim de 24 horas, com a excepção das sementeiras em meio SB, cuja leitura se faz após 48 horas de incubação. As placas foram observadas à lupa, no sentido de identificar morfologicamente as colónias de *E. coli* (azuis em meio TBX e alaranjadas em meio HEA) e *Enterococcus* spp., nomeadamente *E. faecium* e *E. faecalis*: em meio SB, as primeiras com forma lenticular, contorno claro e centro rosa velho e as segundas com forma cónica, mais pequenas e cor vermelho vivo; em meio KAA, ambas geralmente lenticulares e de cor branco-acinzentado. Em cada placa, seleccionaram-se até 3 colónias morfologicamente diferentes e foram transferidas para tubos

contendo meio *Triple Sugar Iron* (TSI) (Oxoid), no caso de *E. coli*, e meio KAA, no caso de *Enterococcus* spp. Os tubos foram posteriormente colocados na estufa a 37°C. Em face de resultado positivo (isto é, alteração da cor da totalidade do meio TSI para amarelo, acompanhada da produção de gás e ausência de precipitados escuros ou alteração da cor do meio KAA para negro), as colónias foram transferidas para meio BPW e colocadas na estufa até apresentarem turvação, sendo de seguida semeadas com zaragatoa em placas com meio *Mueller-Hinton* (M-H) (Oxoid). Para *E. coli*, os seguintes antimicrobianos foram testados pelo método de difusão de disco (Oxoid): ampicilina (AMP, 10 µg); cefoxitina (FOX, 30 µg); Imipenem (IPM, 10 µg); ciprofloxacina (CIP, 5 µg); gentamicina (CN, 120 µg); nitrofurantoína (F, 300 µg); tetraciclina (TE, 30 µg); cefotaxima (CTX, 30 µg); aztreonam (ATM, 30 µg); ceftazidima (CAZ, 30 µg); amoxicilina e ácido clavulânico (AMC, 30 µg); cefalotina (KF, 30 µg); amicacina (AK, 30 µg); estreptomicina (S, 10 µg); ácido nalidíxico (NA, 30 µg); cloranfenicol (C, 30 µg); tobramicina (TOB, 10 µg); sulfametoxazol e trimetoprim (SXT, 25 µg) e canamicina (K, 30 µg). Para *Enterococcus* spp., testaram-se: ampicilina (AMP, 10 µg); quinupristina e dalfopristina (QD, 15 µg); tetraciclina (TE, 30 µg); rifampicina (RD, 5 µg); eritromicina (E, 15 µg); gentamicina (CN, 120 µg); vancomicina (V, 30 µg); azitromicina (AZM, 15 µg); teicoplanina (TEC, 30 µg); cloranfenicol (C, 30 µg); nitrofurantoína (F, 300 µg) e ciprofloxacina (CIP, 5 µg). As placas foram colocadas em estufa a 37 °C e lidas no dia seguinte. Os diâmetros dos halos de inibição foram registados numa base de dados onde constavam a data de colheita da amostra, o local de proveniência, a dieta habitual dos animais, assim como a data de ingresso do animal, espécie, causa de ingresso, dieta em cativeiro e tratamentos com antimicrobianos (no caso de aves).

O tratamento estatístico dos dados foi feito recorrendo ao software SPSS®. Para o estudo da correlação entre as variáveis estudadas, foi usado o método Kendall tau b (*two-tailed*). A selecção deste teste baseou-se no facto de as variáveis em estudo serem do tipo nominal. Também se recorreu ao teste Qui-quadrado de Pearson, quando adequado, considerando estatisticamente significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

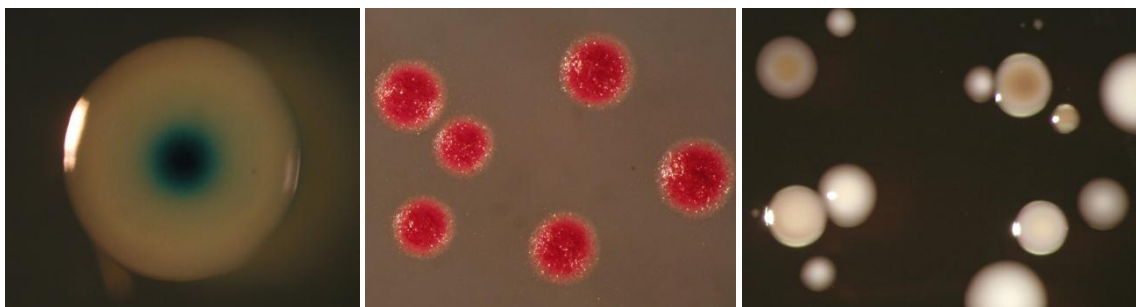
**Resultados.** No caso das aves, num total de 175 amostras foi possível obter 308 isolados fenotipicamente compatíveis com *E. coli*. Destes, apenas 37,7% ( $n = 116$ ) eram sensíveis à totalidade dos antimicrobianos testados, apresentando os restantes 192 isolados resistência a pelo menos um dos fármacos. As comparações efectuadas tomaram como variáveis cada antimicrobiano testado e: a causa de entrada (neste caso, simplificou-se dividindo entre os originários de cativeiro ilegal e os restantes, tendo em conta que este é o maior factor de risco, uma vez que há maior contacto com humanos e os animais são alimentados com carne de animais domésticos e por vezes medicados pelos proprietários); e a

existência ou não de tratamento com antimicrobianos. A origem das aves (CERVAS ou Centro de Recuperação do PNPG) não foi tida em conta, dado que as aves possuem uma grande mobilidade e podem ser encontrados em vários pontos diferentes do país antes de serem transferidos para um centro de recuperação.

Quando analisamos a relação entre a causa de ingresso – cativeiro ilegal ou outra – apenas se encontram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no caso da tetraciclina, cuja taxa global de resistência foi de 41,9% ( $n = 129$ ), contudo atingiu 57,1% ( $n = 64$ ) nos animais provenientes de cativeiro, contra 33,2% ( $n = 65$ ) nos restantes. No caso da relação entre a presença de resistências e os tratamentos com antimicrobianos, dois antibióticos apresentaram diferenças com relevância estatística ( $p < 0,05$ ): tetraciclina, com 46,8% ( $n = 116$ ) resistentes nos animais não sujeitos a tratamento contra 21,7% ( $n = 13$ ) nos animais tratados; e cloranfenicol, com 10,5% ( $n = 26$ ) resistentes nos animais não sujeitos a tratamento contra 1,7% ( $n = 1$ ) nos animais tratados.

Além deste resultado, há ainda que sublinhar o facto de todos os isolados serem sensíveis ao imipenem e à amicacina e que 17,2% ( $n = 53$ ) apresentaram características compatíveis com a produção de BLLE no antibiograma. Os resultados globais estão resumidos no Anexo III, tabela 8.

No total das 159 amostras foi possível obter 229 isolados fenotipicamente compatíveis com *Enterococcus* spp. Destes, apenas 31,4% ( $n = 72$ ) eram sensíveis à totalidade dos antimicrobianos testados, apresentando os restantes 157 isolados resistência a pelo menos um dos fármacos. As comparações efectuadas tomaram como variáveis os mesmos parâmetros usados para *E. coli*, contudo, apenas se encontraram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando se comparou a taxa de resistência ao cloranfenicol com a causa de entrada, com 2,6% resistentes ( $n = 6$ ) nos animais provenientes de cativeiro ilegal contra 0,9% ( $n = 2$ ) nos animais com outras causas de entrada. Os resultados globais estão resumidos no Anexo III, tabela 9.



**Figura 7.** Características morfológicas de colónias de *E. coli* em meio TBX (à esquerda) e *Enterococcus* spp. em meios SB (ao centro) e KAA (à direita) quando observados à lupa (Martins da Costa, 2008).

No caso dos lobos, do total de 21 amostras processadas, foi possível isolar 34 colónias fenotipicamente compatíveis com *E. coli*. Destas, 29,4% ( $n = 10$ ) eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo as restantes 24 resistentes a pelo menos um dos compostos. A origem dos animais foi usada como variável, dado que se procurou saber se a localização geográfica (e os hábitos alimentares distintos) teriam influência na emergência de determinados perfis de resistência. Sendo assim, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para a ampicilina, com 44,1% ( $n = 15$ ) do total de isolados a apresentar resistência a este fármaco, contudo apenas 25% ( $n = 4$ ) dos isolados da subpopulação do norte eram resistentes, contra 61,1% ( $n = 11$ ) a sul do rio Douro. Da mesma forma, a cefoxitina apresentou valores com relevância estatística, tendo uma taxa global de resistência de 14,7% ( $n = 5$ ), com a totalidade destes isolados a pertencer à subpopulação do sul do Douro (27,8% dos isolados provenientes desta região). É ainda de assinalar o resultado obtido para a cefotaxima ( $p = 0,054$ ), por ser um valor-limite. Neste caso, a taxa global de resistência é de 8,8% ( $n = 3$ ), sendo a totalidade dos isolados resistentes provenientes da população a norte do Douro (18,8% dos isolados provenientes desta localização).

Não se isolaram quaisquer estirpes resistentes ao imipenem, nitrofurantoína, amicacina e canamicina. Há ainda a assinalar que 23,5% dos isolados ( $n = 8$ ) apresentaram características compatíveis com a produção de BLLE no antibiograma. Os resultados gerais encontram-se sintetizados no Anexo III, tabela 10.

Das 21 amostras colhidas, apenas foi possível isolar 9 colónias fenotipicamente compatíveis com *Enterococcus* spp., não se tendo feito a distinção entre as diferentes espécies para efeitos deste trabalho. Todos os isolados apresentavam resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Tendo mais uma vez em conta a origem dos animais como variável, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na resistência aos seguintes fármacos: tetraciclina, com uma taxa global de resistência de 88,9% ( $n = 8$ ), abrangendo 100% ( $n = 7$ ) dos isolados do sul e 50% ( $n = 1$ ) dos isolados do norte do Douro; azitromicina, com 66,7% ( $n = 6$ ) do total de isolados a manifestar resistência, todos estes pertencentes à subpopulação do sul do Douro (85,7% dos isolados desta região); e vancomicina, com uma taxa global de resistência de 33,3% ( $n = 3$ ), dos quais 1 isolado pertencia à subpopulação da zona Centro (14,3% destes isolados) e 2 à zona Norte de Portugal (100% dos isolados desta região). De notar que, destes isolados resistentes à vancomicina, aquele proveniente da região sul do Douro era simultaneamente resistente à teicoplanina, enquanto os isolados provenientes do norte do mesmo rio eram ambos sensíveis a esse fármaco.

Todos os isolados foram sensíveis à gentamicina. Os resultados globais estão representados no Anexo III, tabela 11.

**Discussão.** A elevada prevalência de bactérias resistentes à tetraciclina é uma observação recorrente nos vários ensaios realizados, tanto em *E. coli* como *Enterococcus* spp. Este dado parece estar relacionado com o uso alargado deste fármaco, há várias décadas, simultaneamente em Medicina e Medicina Veterinária, tendo-se generalizado a resistência (Barbosa & Levy 2000).

No caso particular dos enterococos, observa-se uma elevada taxa de resistência à quinupristina e dalfopristina, o que leva a suspeitar que apenas uma pequena proporção dos isolados testados correspondia a *Enterococcus faecium*, dado que as restantes espécies possuem resistência intrínseca a estes fármacos (van der Bogaard 2002). Esta observação realça uma das limitações enfrentadas neste trabalho, tendo a identificação das espécies sido baseada somente nas características morfológicas das colónias e em testes bioquímicos simples, como o comportamento em meios como TSI (*E. coli*) ou KAA (*Enterococcus* spp.). Técnicas mais fidedignas de identificação das espécies em estudo – sistema API® (*Analytical Profile Index*), por exemplo – seriam uma mais-valia em estudos deste género.

A sensibilidade de todos os isolados de *E. coli* ao imipenem e a baixa taxa de resistência à gentamicina, amicacina e cefoxitina já haviam sido documentadas em outros trabalhos (Edelstein 2003, Costa *et al.* 2008, Sjölund *et al.* 2008).

O facto de a resistência à tetraciclina (*E. coli*) e ao cloranfenicol (*Enterococcus* spp.) em aves estar positivamente relacionada com a permanência em cativeiro ilegal antes da admissão no Centro de Recuperação pode estar relacionado com a administração de fármacos aos animais pelos proprietários.

Ao contrário do que se esperava inicialmente, a prevalência de *E. coli* resistente aos antimicrobianos (nomeadamente tetraciclina e cloranfenicol) foi menor nas aves que receberam tratamento com antibióticos (sobretudo enrofloxacina). Esta observação pode estar relacionada com o facto de que o tratamento com antibiótico implica uma profunda perturbação nos fenótipos residentes no intestino, eliminando os sensíveis, enriquecendo os resistentes e favorecendo novas colonizações, pelo que os seus efeitos são muito variáveis.

Nas amostras de lobo, mantém-se o padrão de sensibilidade ao imipenem, amicacina (*E. coli*) e gentamicina (*Enterococcus* spp.), sendo também possível concluir que ainda existe uma elevada sensibilidade à nitrofurantoína e canamicina.

Existe uma relação estatisticamente significativa entre a subpopulação a sul do Douro e a prevalência de *E. coli* resistente à ampicilina e cefoxitina e, por outro lado, a população a norte do mesmo rio e a resistência à cefotaxima. Estas observações podem levar-nos a uma

conclusão preliminar acerca dos determinantes envolvidos na expressão da resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente às cefalosporinas de amplo espectro. Para isso, há que ter em conta que as *Enterobacteriaceae* portadoras do gene que codifica para a expressão de  $\beta$ -lactamases da família CTX-M são geralmente resistentes à cefotaxima e sensíveis a outras cefalosporinas e as que expressam  $\beta$ -lactamases da família AmpC são geralmente resistentes à cefoxitina e à ampicilina (Crowley & Ratcliffe 2003, Edelstein *et al.* 2003, Pitout *et al.* 2003, Bonnet 2004, Livermore *et al.* 2007, Galas *et al.* 2008, Mulvey *et al.* 2005). Assim, poder-se-á concluir que existe um predomínio de *E. coli* produtoras de CTX-M na subpopulação a norte do Douro e, por outro lado, de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC a sul do mesmo rio. A análise pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) das estirpes isoladas no laboratório teria permitido confirmar esta hipótese, porém não foi possível recorrer a esta tecnologia no decurso do presente estágio.

No que diz respeito às estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas em lobos, é preciso ter presente que apenas se recuperaram 9 – 7 a sul do Douro e somente 2 a norte – pelo que é arriscado tentar tirar conclusões com base estatística.

A observação mais importante nestes isolados foi a elevada taxa de resistência à vancomicina, sendo de notar que os isolados obtidos a partir da subpopulação do norte de Portugal eram sensíveis à teicoplanina, outro glicopéptido. Já no caso do isolado proveniente da subpopulação fixada a sul do Douro, observou-se resistência à teicoplanina. A resistência simultânea a estes dois fármacos é uma característica em *Enterococcus* spp. portadores do determinante de resistência *vanA*, enquanto que a resistência somente à vancomicina geralmente está associada com determinantes *vanB* ou *vanC* (van der Bogaard *et al.* 2002). Desta forma, poder-se-á concluir que a população lupina a norte do rio Douro alberga *Enterococcus* spp. portadores de *vanB* ou *vanC*, quando que os congéneres do sul adquiriram determinantes do tipo *vanA*, cuja relevância epidemiológica é claramente superior. Mais uma vez, a aplicação da técnica PCR poderia levar à identificação dos genes em causa.

Há ainda que assinalar, sobretudo neste contexto do surgimento de resistências com clara associação a actividades humanas, que os resultados da genética (confirmação da origem dos dejectos como provenientes de animais da espécie *Canis lupus*) estão ainda pendentes. Desta forma, não pode ser de todo descartada a hipótese de alguma das amostras ser proveniente de um canídeo doméstico, o que facilitaria o contacto deste com fontes de contaminação antropogénica.

## 4. Conclusão

---

O presente estágio permitiu contactar com a realidade de um Centro de Recuperação de Fauna Selvagem, com todas as suas valências e limitações. Durante as 16 semanas de contacto, foi possível conhecer melhor as espécies mais comuns que ingressam, sobretudo aves, e as principais causas desses ingressos. No trabalho diário com estes animais, foram sendo aplicados os conhecimentos obtidos ao longo do curso de Medicina Veterinária, com as devidas adaptações, e foram adquiridas novas competências e saberes, nomeadamente ao nível do maneio e biologia das espécies.

Todavia, conforme foi possível perceber durante o presente estágio, o âmbito da recuperação de animais selvagens vai muito além da simples recepção de animais debilitados ou feridos, do seu tratamento e posterior devolução ao habitat natural. É verdade que compreende uma parte importante do trabalho de um Centro de Recuperação enquanto espaço físico, contudo é apenas uma parcela das actividades desenvolvidas no sentido de conservar a fauna selvagem e os seus habitats. Fazem ainda parte das competências de um Centro de Recuperação e Vigilância de animais selvagens a monitorização das populações selvagens – detectando precocemente patologias emergentes ou problemas de conservação –, a formação das populações através de acções de educação ambiental e o apoio a projectos de investigação na área da conservação.

A monitorização das populações selvagens passa pela colheita de amostras cujo processamento resulte em informações acerca do estado sanitário das mesmas, permitindo assim aferir a viabilidade destas e os seus possíveis problemas de conservação. A colheita das amostras deve ser da forma menos invasiva possível, evitando qualquer perturbação nos habitats. Assim, os Centros de recuperação constituem estruturas fundamentais, onde ingressam animais de espécies e origens variadas, sendo possível valorizar as mesmas como sentinelas das suas populações de origem. Além da colheita de amostras nos centros, é possível colher amostras no campo, complementando assim o espectro de animais estudados. Os projectos de monitorização em que houve oportunidade de participar abarcaram duas vertentes distintas, uma no âmbito da parasitologia e outra no campo da microbiologia.

A pesquisa de hemoparasitas no sangue periférico de aves selvagens tomou como amostra animais que deram entrada no CERVAS, abrangendo uma grande variedade de espécies, com diferentes hábitos alimentares e que ocupam habitats distintos. Foi possível concluir que os parasitas mais comuns são *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* spp. e que a sua prevalência nas espécies estava relacionada sobretudo com os habitats explorados, sendo as aves de floresta e de regiões húmidas geralmente mais parasitadas. Esta observação pode ser, por sua vez, explicada à luz dos ciclos de vida dos parasitas estudados – tratando-se de

agentes transmitidos por vectores artrópodes, estes habitats oferecem maior oportunidade à sua sobrevivência. A presença de elevados níveis de parasitémia não pôde, contudo, ser associada conclusivamente com o aparecimento de sinais clínicos característicos. Desta forma, permanece ainda a alguma incerteza acerca do papel destes agentes potencialmente patogénicos na sobrevivência das espécies selvagens.

O segundo projecto de monitorização de populações selvagens visou a caracterização da prevalência de antibiorresistências na flora entérica de aves selvagens (ingressadas em Centros de Recuperação) e lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*). As aves foram subdivididas em grupos consoante o contacto prévio com humanos (provenientes de cativeiro ilegal ou de habitats selvagens) ou administração de antibióticos, tendo sido possível estabelecer relações de causalidade entre estes factores e a emergência de resistências a alguns antimicrobianos. No caso dos lobos, tomaram-se amostras de duas subpopulações nacionais geograficamente separadas entre si e com diferentes graus de contacto com áreas humanizadas. Os hábitos alimentares apresentavam também diferenças com potencial para originar perfis de antibiorresistência distintos – uma subpopulação a norte do rio Douro, com recurso frequente a ungulados domésticos criados em regime extensivo; e uma pequena subpopulação a sul do mesmo rio, cuja alimentação compreende gado criado em regime mais intensivo e resíduos de aviculturas. Sendo espectável uma maior pressão selectiva com antibióticos nas presas dos animais a sul do Douro, tentou-se encontrar uma relação entre a dieta e a presença de bactérias comensais resistentes. Ao contrário do que se esperava inicialmente, a subpopulação do norte não apresentava menor taxa de resistência, contudo os padrões da mesma eram distintos, sendo possível perscrutar a expressão de distintos determinantes de resistência nas duas localizações geográficas consideradas. Este trabalho não visou a compreensão das consequências da resistência para os animais estudados, tendo antes como objectivo proporcionar uma ideia da magnitude da acção humana nos ecossistemas. A contaminação destes com resíduos de fármacos com acção antimicrobiana e bactérias resistentes tem consequências que vão para além da Saúde Animal ou Pública, degradando os ecossistemas e perturbando o equilíbrio físico-químico e biológico de todos os organismos vivos.

No contexto actual, o Médico Veterinário alcança uma nova relevância na abordagem à Saúde na perspectiva da Medicina da Conservação, deixando de ser um técnico que intervém apenas no indivíduo ou em patologias emergentes com elevada mortalidade. Tendo em conta a sua extensa formação nas áreas da Saúde Animal, Saúde Pública, Epidemiologia, Toxicologia e Ecologia, o veterinário passa a fazer parte do núcleo vital de qualquer equipa de trabalho no âmbito da conservação. Apenas alguém com estas competências tem a capacidade de compreender na globalidade a dinâmica das patologias entre animais selvagens, animais domésticos e o Homem, e assim propor planos de acção e estratégias de controlo realistas.

## 5. Bibliografia

---

- Acar J, Röstel B (2001) "Antimicrobial resistance: an overview" **Revue Scientific et Technique de L'office International des Epizooties** 20, 797-810
- Aguirre A, Ostfeld R, Tabor G, House C, Pearl M (2002) **Conservation Medicine: Ecological Health in Practice**, 1.<sup>a</sup> edição, Oxford University Press
- Angulo F, Nargund V, Chiller T (2004) "Evidence of an association Between Use of Anti-microbial Agents in Food Animals and Anti-microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance" **Journal of Veterinary Medicine Series B** 51, 374-379
- Anhauser H, Woelfing P (1985) "Pro and cons of raptor rehabilitation centres: A general view" **Birds of Prey** 3, 164-168
- Barbosa T, Levy S (2000) "The impact of antibiotic use on resistance development and persistence" **Drug Resistance Updates** 3, 303-311
- Blanco G, Gajón A, Doval G, Martínez F (1998) "Absence of Blood Parasites in Griffon Vultures from Spain" **Journal of Wildlife Diseases** 34, 640-643
- Blanco G, Lemus J, Grande J (2006) "Faecal bacteria associated with different diets of wintering red kites: influence of livestock carcass dumps in microflora alteration and pathogen acquisition" **Journal of Applied Ecology** 43, 990-998
- Bogaard A, Willems R, London N, Top J, Stobberingh E (2002) "Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughteres" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 49, 497-505
- Bonnet R (2004) "Growing Group of Extended-Spectrum B-Lactamases: the CTX-M Enzymes" **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48, 1-14
- Cabral M, Almeida J, Almeida P, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira M, Palmeirim J, Queiroz A, Rogado L, Santos-Reis M (2006) **Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal**, Instituto da Conservação da Natureza
- Campbell T, Ellis C (2007) **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**, Wiley Blackwell
- Coles B (2007) **Essentials of Avian Medicine and Surgery**, 3<sup>a</sup> edição, Blackwell Publishing
- Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Coelho A, Matos M, Rojo-Bezares B, Rodrigues J, Torres C (2008) "Mechanisms of Antibiotic Resistance in Escherichia coli Isolates Recovered from Wild Animals" **Microbial Drug Resistance** 14, 71-75
- Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C (2006) "Detection of Escherichia coli harbouring extended-spectrum B-Lactamases of the CTX-M TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1311-1312

- Costa P, Bica A, Bernardo F, Vaz-Pires P (2008) "Effects of Antimicrobial Treatment on Selection of Resistant *Escherichia coli* in Broiler Fecal Flora" **Microbial Drug Resistance** 14, 299-306
- Costa P, Nunes T, Vaz-Pires P, Bernardo F (2006) "Reprodutibilidade e especificidade dos métodos de detecção de *Enterococcus* spp. em águas e lamas colhidas em estações de tratamento de águas residuais" **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 101, 273-281
- Crowley B, Ratcliffe G (2003) "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacter cloacae*: understanding but clinically significant" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 51, 1316-1317
- Dancer S (2004) "How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy" **The Lancet Infectious Diseases** 4, 611-619
- Deem S, Karesh W, Weism W (2000) "Putting Theory into Practice: Wildlife Health in Conservation" **Conservation Biology** 15, 1224-1233
- Donázar J (1993) **Los Buitres Ibéricos. Biología y Conservación**, J.M.Reyero
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L (2003) "Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals" **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47, 3724-3732
- Fluit A, Visser M, Schmitz F (2001) "Molecular Detection of Antimicrobial Resistance" **Clinical Microbiology Reviews** 14, 836-871
- Gaibani G, Csermely D (2007) "Behavioral studies" in Bird D, Bildstein K, **Raptor Research and Management Techniques**, Hancock House Pub
- Galas M, Decousser J, Breton N, Godard T, Allouch P, Pina P (2008) "Nationwide Study of the Prevalence, Characteristics and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France" **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52, 786-789
- Greiner E, Ritchie B (1994) "Parasites" in Ritchie B, Harrison G, Harrison L, **Avian Medicine: Principles and Application**, Wingers Publishing, Inc, 1007-1029
- Grilo C, Moço G, Cândido A, Alexandre A, Petrucci-Fonseca F (2002) **Bases para a definição de corredores ecológicos na conservação de uma população marginal e fragmentada: o caso da população lupina a sul do rio Douro - Primeira fase**, Centro de Biologia Ambiental
- Lafferty K, Gerber L (2002) "Good Medicine for Conservation Biology: the Intersection of Epidemiology and Conservation Theory" **Conservation Biology** 16, 593-604
- Lanfranchi P, Ferroglio E, Poglayen G, Guberti V (2003) "Wildlife Veterinarian, Conservation and Public Health" **Veterinary Research Communications** 27, 567-574
- Lemus J, Blanco G, Grande J, Arroyo B, Garcia-Montijano M, Martínez F (2008) "Antibiotics Threaten Wildlife: Circulating Quinolone Residues and Disease in Avian Scavengers" **Plos One** 1, 1-6

Livermore D, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini G, Arlet G, Ayala J, Coque T, Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N (2007) "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 59, 165-174

McEwen S, Fedorka-Cray P (2002) "Antimicrobial Use and Resistance in Animals" **Infectious Diseases Society of America** 34, 93-106

Mech D, Boitani L (2003) **Wolves Behavior, Ecology, and Conservation**, The University of Chicago Press

Meffe G (1999) "Conservation Medicine" **Conservation Biology** 13, 953-954

Merino S, Potti J, Fargallo J (1997) "Blood Parasites of Passarine Birds from Central Spain" **Journal of Wildlife Diseases** 33, 638-641

Middleton J, Ambrose A (2005) "Enumeration and Antibiotic Resistance Patterns of Fecal Indicator Organisms Isolated from Migratory Canada Geese (*Branta canadensis*)" **Journal of Wildlife Diseases** 41, 334-341

Moulin G, Cavalié P, Pellanne I, Chevance A, Laval A, Millemann Y, Colin P, Chauvin C (2008) "A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1-9

Mulvey M, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Land A, Simor A, Paton S (2005) "Molecular Characterization of Cefoxitin-Resistant *Escherichia coli* from Canadian Hospitals" **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49, 358-365

Negro J, Sarasola J, Barclay J (2007) "Augmenting Wild Populations and Food Resources" in Bird D, Bildstein K, **Raptor Research and Management Techniques**, Hancock House Pub

Osofsy S, Karesh W, Deem S (2000) "Conservation Medicine: a Veterinary Perspective" **Conservation Biology** 14, 336-337

Pitout J, Hossain A, Hanson N (2004) "Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M- $\beta$  - Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp." **Journal of Clinical Microbiology** 42, 5715-5721

(2004) **Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases**, World Health Organization

Roque S, Álvares F, Petrucci-Fonseca F (2001) "Utilización espacio-temporal y hábitos alimentarios de un grupo reproductor de lobos en el noroeste de Portugal" **Galemys** 23, 179-198

Roque S, Espírito-Santo C, Grilo C, Rio-Maior H, Petrucci-Fonseca F (2005) **A população lupina a sul do rio Douro em Portugal: Análise temporal, atitudes públicas e aperfeiçoamento dos corredores ecológicos.**

Schloegel L, Daszak P (2004) "Conservation Medicine: Tackling the Root Causes of emerging Infectious Diseases and Seeking Practical Solutions" **The Humane Society of the United States and The HSUS Wildlife Land Trust** 8, 2-7

Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G, Pinhassi J, Kahlmeter G, Olsen B (2008) "Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic" **Centers for Disease Control and Prevention** 14, 70-71

Summers A (2002) "Generally Overlooked Fundamentals of Bacterial Genetics and Ecology" **Infectious Diseases Society of America** 34, 85-92

Tomé R, Santos N, Cardia P, Ferrand N, Korpimäki E (2005) "Factors affecting the prevalence of blood parasites of little owls *Athene noctua* in southern Portugal" **Ornis Fennica** 82, 63-72

Weinhold B (2003) "Conservation Medicine" **Environmental Health Perspectives** 111, 525-529

Wobeser G (2006) **Essentials of Disease in Wild Animals**, Blackwell Publishing

## 6. Anexos

### Anexo I

**Tabela 1.** Espécies (e respectiva Ordem taxonómica) estudadas no âmbito da pesquisa de hemoparasitas em aves.

Espécie	N.º de esfregaços	Ordem	N.º de esfregaços/Ordem
Cegonha-branca ( <i>Ciconia ciconia</i> )	16	Ciconiiformes	22
Garça-real ( <i>Ardea cinerea</i> )	5		
Garça-branca-pequena ( <i>Egretta garzetta</i> )	1		
Águia-de-asa-redonda ( <i>Buteo buteo</i> )	24	Falconiformes	60
Grifo ( <i>Gyps fulvus</i> )	9		
Milhafre-preto ( <i>Milvus migrans</i> )	8		
Açor ( <i>Accipiter gentilis</i> )	5		
Peneireiro-vulgar ( <i>Falco tinnunculus</i> )	4		
Águia-cobreira ( <i>Circaetus gallicus</i> )	3		
Gavião ( <i>Accipiter nisus</i> )	2		
Ógea ( <i>Falco subbuteo</i> )	2		
Bútio-vespeiro ( <i>Pernis apivorus</i> )	2		
Águia-calçada ( <i>Hieraaetus pennatus</i> )	1		
Corvo ( <i>Corvus corax</i> )	2		
Mocho-galego ( <i>Athene noctua</i> )	10	Strigiformes	29
Coruja-do-mato ( <i>Strix aluco</i> )	7		
Bufo-real ( <i>Bubo bubo</i> )	5		
Coruja-das-torres ( <i>Tyto alba</i> )	3		
Noitibó-cinzento ( <i>Caprimulgus europaeus</i> )	2		
Mocho-de-orelhas ( <i>Otus scops</i> )	2		

**Tabela 2.** Número e percentagem de esfregaços com *Leucocytozoon* spp., nas diferentes espécies de aves.

Espécie	n infestados	% infestados
<i>Buteo buteo</i>	9	37,5
<i>Athene noctua</i>	7	70
<i>Bubo bubo</i>	3	60
<i>Strix aluco</i>	3	42,9
<i>Accipiter gentilis</i>	2	40
<i>Accipiter nisus</i>	2	100
<i>Ardea cinerea</i>	0	0
<i>Caprimulgus europaeus</i>	0	0
<i>Ciconia ciconia</i>	0	0
<i>Circaetus gallicus</i>	0	0

<i>Corvus corax</i>	0	0
<i>Egretta garzetta</i>	0	0
<i>Falco subbuteo</i>	0	0
<i>Falco tinnunculus</i>	0	0
<i>Gyps fulvus</i>	0	0
<i>Hieraaetus pennatus</i>	0	0
<i>Milvus migrans</i>	0	0
<i>Otus scops</i>	0	0
<i>Pernis apivorus</i>	0	0
<i>Tyto alba</i>	0	0
<b>Total esfregaços com <i>Leucocytozoon</i> spp.</b>	26	23

**Tabela 3.** Número e percentagem de esfregaços com *Haemoproteus* spp., nas diferentes espécies de aves.

Espécie	<i>n</i> infestados	% infestados
<i>Falco subbuteo</i>	2	100
<i>Buteo buteo</i>	1	4,2
<i>Accipiter gentilis</i>	0	0
<i>Accipiter nisus</i>	0	0
<i>Ardea cinerea</i>	0	0
<i>Athene noctua</i>	0	0
<i>Bubo bubo</i>	0	0
<i>Caprimulgus europaeus</i>	0	0
<i>Ciconia ciconia</i>	0	0
<i>Circaetus gallicus</i>	0	0
<i>Corvus corax</i>	0	0
<i>Egretta garzetta</i>	0	0
<i>Falco tinnunculus</i>	0	0
<i>Gyps fulvus</i>	0	0
<i>Hieraaetus pennatus</i>	0	0
<i>Milvus migrans</i>	0	0
<i>Otus scops</i>	0	0
<i>Pernis apivorus</i>	0	0
<i>Strix aluco</i>	0	0
<i>Tyto alba</i>	0	0
<b>Total esfregaços com <i>Haemoproteus</i> spp.</b>	3	2,7

**Tabela 4.** Número e percentagem de esfregaços com *Trypanosoma* spp., nas diferentes espécies de aves.

Espécie	<i>n</i> infestados	% infestados
<i>Athene noctua</i>	2	20
<i>Bubo bubo</i>	1	20
<i>Accipiter gentilis</i>	0	0

<i>Accipiter nisus</i>	0	0
<i>Ardea cinerea</i>	0	0
<i>Buteo buteo</i>	0	0
<i>Caprimulgus europaeus</i>	0	0
<i>Ciconia ciconia</i>	0	0
<i>Circaetus gallicus</i>	0	0
<i>Corvus corax</i>	0	0
<i>Egretta garzetta</i>	0	0
<i>Falco subbuteo</i>	0	0
<i>Falco tinnunculus</i>	0	0
<i>Gyps fulvus</i>	0	0
<i>Hieraaetus pennatus</i>	0	0
<i>Milvus migrans</i>	0	0
<i>Otus scops</i>	0	0
<i>Pernis apivorus</i>	0	0
<i>Strix aluco</i>	0	0
<i>Tyto alba</i>	0	0
<b>Total esfregaços com <i>Trypanosoma</i> spp.</b>	3	2,7

**Tabela 5.** Número e percentagem de esfregaços com *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp. e *Trypanosoma* spp. nas diferentes ordens taxonómicas de aves.

Ordem	<i>Leucocytozoon</i> spp.		<i>Haemoproteus</i> spp.		<i>Trypanosoma</i> spp.	
	<i>n</i> infestados	% infestados	<i>n</i> infestados	% infestados	<i>n</i> infestados	% infestados
Ciconiiformes	0	0	0	0	0	0
Falconiformes	14	23	3	4,9	0	0
Passeriformes	0	0	0	0	0	0
Strigiformes	12	40	0	0	3	10

**Tabela 6.** Número médio de parasitas por campo de observação (1000x) nos três géneros de parasitas estudados.

Parasitas/campo (1000x)	<i>Leucocytozoon</i> spp.	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Trypanosoma</i> spp.
	<i>n</i> esfregaços	<i>n</i> esfregaços	<i>n</i> esfregaços
menos de 1	14	0	3
1	5	0	0
2	2	2	0
3	1	1	0
4	2	0	0
5 ou mais	2	0	0

## Anexo II

**Tabela 7.** Antimicrobianos testados, respectivas famílias, mecanismos de acção e principais mecanismos de resistência. (Fluit *et al.* 2001)

Classes de antimicrobianos	Antimicrobianos testados	Mecanismos de acção	Mecanismos de resistência
<b>Aminoglicosídeos (Gram positivas e negativas)</b>	Gentamicina (CN) Tobramicina (TOB) Amicacina (AK) Estreptomina (S) Canamicina (K)	Ligação aos ribossomas, interferindo com a síntese proteica.	Sobretudo Gram negativas; degradação enzimática do composto; alguns sistemas de efluxo e mutações no RNA alvo.
<b>Anfenicóis (Gram positivas e negativas)</b>	Cloranfenicol (C)	Ligação à unidade 50S dos ribossomas, inibindo a síntese proteica.	Inactivação enzimática do composto; em bactérias Gram negativas também se observam diminuição da permeabilidade membranar e efluxo activo do antimicrobiano.
<b><math>\beta</math>-lactâmicos (Gram positivas e negativas)</b>	Ampicilina (AMP) Imipenem (IPM) Aztreonam (ATM) Amoxicilina (AMC)* Cefalotina (KF) Cefoxitina (FOX) Cefotaxima (CTX) Ceftazidima (CAZ)	Ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBP), envolvidas na síntese da parede celular.	Degradação enzimática do anel $\beta$ -lactâmico (por acção de $\beta$ -lactamases); também se observam mutações nas PBP e, mais raramente, diminuição da permeabilidade celular ou efluxo. <i>Enterobacteriaceae</i> podem produzir $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL).
<b>Quinolonas (Gram positivas e negativas)</b>	Ciprofloxacina (CIP) Ácido nalidíxico (NA)	Inibição de topoisomerasas bacterianas (ADN girase e Topoisomerase IV).	Alteração das enzimas-alvo e diminuição da permeabilidade. Também se pode observar diminuição da afinidade do alvo para a ligação e efluxo.
<b>Macrólidos e Streptograminas (Gram positivas e negativas)</b>	Azitromicina (AZM) Eritromicina (E) Quinupristina e Dalfopristina (QD)	Inibição da síntese proteica através da ligação a unidades do ribossoma.	Diminuição da permeabilidade (Gram negativas) e alteração do alvo de ligação (Gram positivas).
<b>Nitrofuranos (Gram positivas e negativas)</b>	Nitrofurantoína (F)	Danificação do ADN bacteriano através de uma reacção de oxidação.	Inibição da nitrofurano reductase, impedindo a reacção redox.
<b>Sulfamidas e Trimetoprim (Gram positivas e negativas)</b>	Sulfametoxazole e Trimetoprim (SXT)	Ligação às enzimas dihidropteroato sintetase e dihidrofolato reductase, impedindo a síntese de aminoácidos e nucleótidos.	Sobreprodução das enzimas-alvo, mutações nos genes estruturais e produção de enzimas resistentes à inactivação.
<b>Tetraciclina (Gram positivas e negativas)</b>	Tetraciclina (TE)	Ligação à subunidade 30S do ribossoma, inibindo a síntese proteica.	Efluxo ou protecção ribossomal; também destruição do composto por oxidação.
<b>Glicopéptidos (Gram positivas)</b>	Vancomicina (V) Teicoplanina (TEC)	Ligação às cadeias laterais do peptidoglicano, impedindo a síntese da parede celular.	Alteração das moléculas-alvo, utilizando outras cuja afinidade para o antibiótico é menor. VanA é o fenótipo mais comum e que se manifesta por um elevado nível de resistência.
<b>Rifamicinas (sobretudo Gram positivas)</b>	Rifampicina (RD)	Inibição da síntese proteica através da ligação à RNA polimerase.	Alteração da enzima-alvo.

\*O antimicrobiano Amoxicilina foi testado em associação com Ácido Clavulânico.

### Anexo III

**Tabela 8.** Taxas e número de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos testados para isolados de *E. coli* em aves.

Antimicrobiano	Taxa de isolados resistentes (%)	Número de isolados resistentes (n)
AMP	50,6	156
FOX	0,6	2
IPM	0	0
CIP	21,4	66
CN	3,2	10
F	1,6	5
TE	41,9	129
CTX	14,9	46
ATM	3,2	10
CAZ	1	3
AMC	1,6	5
KF	39	120
AK	0	0
S	37	114
NA	43,8	135
C	8,8	27
TOB	1,9	6
SXT	43,2	133
K	6,2	19

**Tabela 9.** Taxas e número de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos testados para isolados de *Enterococcus* spp. em aves.

Antimicrobiano	Taxa de isolados resistentes (%)	Número de isolados resistentes (n)
AMP	0,4	1
QD	34,5	79
TE	47,2	108
RD	26,6	61
E	23,6	54
CN	0,9	2
V	2,6	6
AZM	26,2	60
TEC	2,2	5
CN	3,5	8
F	1,7	4
CIP	6,1	14

**Tabela 10.** Taxas e número de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos testados para isolados de *E. coli* em lobos.

Antimicrobiano	Taxa de isolados resistentes (%)	Número de isolados resistentes (n)
AMP	44,1	15
FOX	14,7	5
IPM	0	0
CIP	17,6	6
CN	5,9	2
F	0	0
TE	20,6	7
CTX	8,8	3
ATM	2,9	1
CAZ	5,9	2
AMC	23,5	8
KF	52,9	18
AK	0	0
S	47,1	16
NA	17,6	6
C	11,8	4
TOB	2,9	1
SXT	14,7	5
K	0	0

**Tabela 11.** Taxas e número de isolados resistentes a cada um dos antimicrobianos testados para isolados de *Enterococcus* spp. em lobos.

Antimicrobiano	Taxa de isolados resistentes (%)	Número de isolados resistentes (n)
AMP	22,2	2
QD	66,7	6
TE	88,9	8
RD	33,3	3
E	44,4	4
CN	0	0
V	33,3	3
AZM	66,7	6
TEC	11,1	1
CN	22,2	2
F	11,1	1
CIP	11,1	1