



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**IMPACTOS AMBIENTAIS E INDICADORES DE RISCO DE INTRODUÇÃO
DE PATÓGENOS VEICULADOS POR AVES MIGRATÓRIAS NO BRASIL**

PEDRO CERQUEIRA LIMA

Salvador-Bahia
2017

PEDRO CERQUEIRA LIMA

**IMPACTOS AMBIENTAIS E INDICADORES DE RISCO DE INTRODUÇÃO
DE PATÓGENOS VEICULADOS POR AVES MIGRATÓRIAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof.º Dr. Carlos Roberto Franke

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Anilton Alves Araújo

Salvador-Bahia
2017

Sistemas de Bibliotecas - UFBA

Lima, Pedro Cerqueira.

Impactos ambientais e indicadores de risco de introdução de patógenos veiculados por aves migratórias no Brasil . - 2017.

116 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Franke.

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Anilton Alves Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e

Zootecnia, Salvador, 2017.

1. Aves. 2. Aves - Doenças. 3. Botulismo. 4. Zoonoses. 5. Flavivírus. 6. Ecoepidemiologia.
I.Franke, Carlos Roberto. II. Araújo, Francisco Anilton Alves. III. Universidade Federal da Bahia.
Escola de Medicina e Zootecnia. IV. Título.

CDD - 598
CDU - 568.2

PEDRO CERQUEIRA LIMA

**IMPACTOS AMBIENTAIS E INDICADORES DE RISCO DE INTRODUÇÃO DE
PATÓGENOS VEICULADOS POR AVES MIGRATÓRIAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Franke (Orientador)

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFBA)

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Prof^a . Dra. Lia Muniz Barreto Fernandes

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFBA)

Prof. Dr. Cláudio de Oliveira Romão

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFBA)

Prof. Dr. Aroldo José Borges Carneiro

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFBA)

Aprovada em :

Salvador 29 / 08 /2017

Universidade Federal da Bahia

Dedico este estudo, em especial, a minha esposa Rita Rocha, aos meus filhos Pedro, Thyers e Aloísio, e a todos os meus mestres, colegas de turma, amigos e familiares que me apoiaram durante essa minha jornada de vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho. Entretanto, gostaria de destacar algumas dessas pessoas e agradecer aos demais, de coração, por toda ajuda e incentivo;

Inicialmente, agradeço a Deus por tudo: pela sua presença em minha vida e pela fé que me motiva e faz prosseguir em busca dos meus ideais principalmente nos momentos de dificuldades e *In memoriam* aos meus pais: Thyers Novaes de Cerqueira Lima e Gizelia Antônia Pita que souberam dar uma criação rígida e direcionada para que eu e meus seis irmãos conseguíssemos chegar e concluir uma Universidade Pública;

Ao meu orientador, Dr. Carlos Roberto Franke, por ter aceitado o desafio de realizar este trabalho comigo e, sobretudo, pela sua amizade e dedicação que foram fundamentais para o meu aprendizado;

A minha esposa Rita Rocha que sempre me apoiou na minha jornada de vida. Esse apoio foi fundamental para ao meu desenvolvimento, principalmente profissional;

Ao meu inesquecível amigo, Rolf Grantsau *In memoriam* pela ajuda e conselhos que me foram dados durante mais de duas décadas de convivência e aprendizado;

Ao colega e amigo Ricardo Lustosa pela sua parceria e pela colaboração na elaboração dos mapas que ilustram esta tese;

Aos funcionários e amigos do Ministério da Saúde: Alessandro Pacego Martins Romano, Pollyanna Cardoso Araújo, Daniel Garkauskas Ramos e Pedro Henrique de Oliveira Passos;

Aos amigos (as), Marco Antônio Barreto de Almeida, Vivyanne Santiago Magalhães, Luiz Eloy Pereira e Eliana Vieira Pinto da Silva entre outros pela ajuda e apoio durante todos os trabalhos de campo para a coleta das amostras;

Aos funcionários da Secretaria de Saúde do Estado do Piauí que deram total apoio nas pesquisas de campo e aqueles que montaram toda a logística: transporte, hospedagem, alimentação etc...;

Um agradecimento especial ao meu grande amigo e Coorientador Dr. Francisco Anilton Alves Araújo, que por muito tempo coordenou as pesquisas sobre doenças emergentes no Ministério da Saúde com quem muito aprendi sobre inquéritos com aves e que deu um novo rumo nas minhas pesquisas;

A minha amiga Helen Hays e ao amigo Joseph Dicostanzo do American Museum of Natural History de Nova Iorque pelo apoio que vem dando às pesquisas com aves migratórias;

Aos funcionários da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho e, especialmente, a Kátia e Angélica, secretárias do curso de Pós-graduação;

Ao amigo Zildomar Souza Magalhães pela participação e ajuda nos trabalhos de campo, ajuda esta de grande importância para o sucesso das pesquisas realizadas;

A minha irmã, Ana Lima, por ter me ajudado na revisão dos textos, nas estatísticas, e por todo o incentivo que me foi dado durante o Mestrado e Doutorado;

Ao amigo Marcos Jesuino L. Nogueira, que prestou uma grande ajuda na primeira e segunda viagem de campo, em busca de dados sobre o fenômeno de mortandade das aves no Município de Remanso na Bahia;

A minha colega de turma e amiga Ianei de Oliveira Carneiro, que fez parte da minha equipe em algumas disciplinas do Doutorado;

A FAPESB pela bolsa de Doutorado, um recurso importante, que colaborou de forma significativa no desenvolvimento das minhas pesquisas;

A Dr^a Livia Caricio, diretora do Instituto Evandro Chagas (IEC), e aos servidores dos Laboratórios do Instituto, que foram responsáveis pelas análises das amostras, e a todos aqueles que participaram das pesquisas de campo;

A CETREL, Empresa na qual trabalhei e dediquei parte significativa da minha vida em pesquisas com aves. Em especial aos Diretores; Fonte Lima, José Antônio Andrade, Carlos Eugênio Bezerra de Meneses e Ney Silva. A todos os Técnicos de Laboratório da CETREL que colaboraram com a realização de análises e aos demais funcionários terceirizadas que sempre apoiaram as minhas pesquisas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | A dispersão do vírus do Nilo Ocidental –VNO– no mundo de 1994 a 2011.... | 19 |
| Figura 2 | Gaio-azul (<i>Cyanocitta cristata</i>) (esquerda) e corvo-americano (<i>Corvus sp</i>) (direita), espécies capazes de propagar o VNO por transmissão horizontal. ... | 20 |
| Figura 3 | Esconderijo de folhas e caçador (esquerda). A direita, Pombas-de-bando (<i>Zenaida auriculata</i>) mortas. Espécie migratória que utiliza o Bioma Caatinga, Nordeste do Brasil, no seu trajeto de migração. As pombas são abatidas quando tentam beber água, 2014..... | 20 |
| Figura 4 | <i>Turdus migratorius</i> (esquerda), principal reservatório no ciclo de transmissão do VNO e <i>Quiscalus quiscula</i> (direita), responsável pela dispersão explosiva da epidemia do VNO na América do Norte..... | 24 |
| Figura 5 | <i>Coereba flaveola</i> (esquerda) e <i>Turdus leucomelas</i> (direita), espécies que apresentaram sorologia positiva para o VNO na Venezuela e Caribe..... | 25 |
| Figura 6 | Espécies que apresentaram indivíduos soropositivos para VNO na Argentina: <i>Dendrocygna bicolor</i> (1), <i>Zenaida auriculata</i> (2) e <i>Columbina picui</i> (3)..... | 26 |
| Figura 7 | Mapa de distribuição do Zanate-mexicano (<i>Quiscalus mexicanus</i>)..... | 28 |
| Figura 8 | Trabalhador rural, no estado do Piauí foi o primeiro caso humano de FNO no Brasil, 2014. O quadro clínico apresentou fraqueza muscular grave e paralisia flácida completa, que impossibilitava a locomoção..... | 31 |
| Figura 9 | Carcaças de aves dispostas nas margens de lago da Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia/Brasil, 2008..... | 32 |
| Figura 10 | Aves aquáticas, encontradas debilitadas na borda de um pequeno lago adjacente à Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia, Brasil, 2008..... | 33 |
| Figura 11 | <i>Dendrocygna viduata</i> , representante da família <i>Anatidae</i> , encontrado debilitado em uma ilha de vegetação na Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia, Brasil (foto esquerda), 2008..... | 34 |
| Figura 12 | <i>Netta erythrophthalma</i> , com paralisia da pálpebra interna, ou membrana nictitante encontrada na borda da Barragem de Sobradinho/BA, 2008..... | 34 |
| Figura 13 | <i>Dendrocygna viduata</i> , prestes a se afogar por causa da paralisia flácida dos músculos do pescoço, incapacitada de manter a cabeça ereta, em virtude do botulismo, 2008..... | 35 |
| Figura 14 | Ciclo epidemiológico do botulismo em aves, a partir das larvas de insetos presentes em carcaças e sua ingestão pelas aves. | 38 |

- Figura 15 Caracterização geográfica do município de Aroeiras do Itaim, área de captura das aves e local de residência do primeiro caso humano de febre do Nilo Ocidental (FNO) no Brasil..... 56
- Figura 16 A esquerda, Lago da Represa de Sobradinho, Rio São Francisco, município de Remanso, Bahia, Brasil, em período de seca, com apenas 19,0% de sua capacidade de armazenamento de água. A direita, aves debilitadas, coletadas em lagoas rasas, formadas pela redução do nível de água do lago da represa, 2008. 71
- Figura 17 Cinco áreas de lagoas rasas (L1 1 a L5), formadas, em virtude da seca, pela redução do nível de água do Lago da Represa de Sobradinho, localizado no Rio São Francisco, no Município de Remanso, estado da Bahia, Brasil, onde a mortalidade de aves foi investigada. L1 (Fazenda Pageú), L2 (Lab1), L3 (Balões), L4 (Via aparecida), L5 (Riacho Carnaúba) e L6 (Lagoa Carnaúba-feijão)..... 71
- Figura 18 A esquerda, Urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aurea*) e a direita, uma carcaça de Irerê (*Dendrocygna viduata*), destroçada pelos abutres na área de estudo, próximo ao Lago da Represa de Sobradinho, Município de Remanso, Bahia/ Brasil, 2008..... 79

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Resultados sorológicos das espécies de aves silvestres submetidas à pesquisa de anticorpos anti-VNO (Vírus do Nilo Ocidental) e de outros arbovírus pelas técnicas de Inibição de Hemaglutinação (IH) e de Neutralização por Redução de Placas (PRNT) | 60 |
| Tabela 2 | Famílias e espécies de aves identificadas na área de estudo, discriminadas quanto ao número de indivíduos debilitados+mortos, hábito alimentar e local de forrageamento em relação à lâmina d'água das pequenas lagoas junto ao Lago da Represa de Sobradinho, município de Remanso, Bahia 2008 | 74 |
| Tabela 3 | Resultado da pesquisa direta de toxina botulínica pelo teste de bioensaio, segundo técnica do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) e neutralização em camundongo, dos materiais biológicos das diferentes espécies de patos encontrados mortos. Diagnósticos realizados no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Unesp-Campus de Araçatuba, SP, 2008..... | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AROAV - Vírus Aroa

BLMV - Vírus Belém

BSQV - Vírus Bussuquara

CARV - Vírus Carapuru

CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das Aves Silvestres

CATUV - Vírus Catú

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPCV - Vírus Cacicaporé

DENV - Vírus da Dengue

EE - Encefalite Equina

EEEV - Vírus da Encefalite Equina do Leste

ICOV - Vírus Icoaraci

IH - Inibição de Hemaglutinação

ILHV - Vírus Ilhéus

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IGUV - Vírus Iguape

JEV - Vírus da Encefalite Japonesa

KUNV - Vírus Kunjin

KOKV - Vírus Kokobera

STRV - Vírus Stratford

ALFV - Vírus Alfuy

MAGV - Vírus Maguari

MAYV - Vírus Mayaro

MUCV - Vírus Mucambo

MVEV - Vírus Murray Valley

NJLV - Vírus Naranjal

OROV - Vírus Oropouche

PRNT - Teste de Neutralização por Redução de Placas

RC - Reação Cruzada

RM - Reação Monotípica

PCR - Polymerase Chain Reaction

SLEV - Vírus da Encefalite de Saint Louis

SLE - Encefalite de Saint Louis

JE - Sorogrupo vírus da encefalite japonesa

SN - Soroneutralização

TCMV - Vírus Tacaiuma

USUV - Vírus Usutu

UTIV - Vírus Utinga

VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

WEEV - Vírus da Encefalite Equina do Oeste

VNO - Vírus da Febre do Nilo Ocidental

FNO- Febre do Nilo Ocidental

YF - Febre Amarela

YFV - Vírus da Febre Amarela

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 1.1 Vírus do Nilo Ocidental | 17 |
| 1.2 Botulismo | 32 |
| 2 HIPÓTESES DO TRABALHO | 42 |
| 3.OBJETIVOS DO TRABALHO | 42 |
| 3.1 Objetivo Geral | 42 |
| 3.2 Objetivos específicos | 42 |
| 4 REFERÊNCIAS | 44 |
| 5 ARTIGO CIENTÍFICO I | 52 |
| Evidência sorológica de infecção prévia por arbovirus em aves silvestres da área de registro do primeiro caso humano de encefalite pelo vírus do Oeste do Nilo no Brasil | |
| RESUMO | 52 |
| ABSTRACT | 53 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 54 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| 5.3 RESULTADOS | 59 |
| 5.4 DISCUSSÃO | 60 |
| AGRADEIMENTOS | 63 |
| REFERÊNCIAS | 64 |

| | |
|--|-----|
| 6 ARTIGO CIENTÍFICO II | 67 |
| Epizootia em aves silvestres de ambiente aquático de vida livre causada por <i>Clostridium botulinum</i> , Brasil | |
| RESUMO | 67 |
| ABSTRACT | 68 |
| 6.1 INTRODUÇÃO | 69 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 6.3 RESULTADOS | 74 |
| 6.4 DISCUSSÃO | 79 |
| AGRADEIMENTOS | 82 |
| REFERÊNCIAS | 83 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES | 87 |
| APÊNDICES | 88 |
| ANEXOS..... | 101 |

RESUMO

Diversos agravos à saúde, de espécies de aves silvestres e domésticas, representam risco também à saúde humana. Doenças emergentes ou de registro raro na literatura merecem atenção em vista da dificuldade em diagnosticá-las corretamente e tratá-las em tempo hábil decorre do despreparo dos profissionais, carência de recursos laboratoriais e de dados ecoepidemiológicos sobre as espécies de hospedeiros e as etiologias possivelmente envolvidas tanto nos casos humanos quanto no animais. O presente trabalho se dedica ao estudo de duas enfermidades ainda não descritas nas circunstâncias em que elas ocorreram no Brasil. O primeiro estudo aborda a Febre no Nilo Ocidental (FNO), com seu primeiro registro de ocorrência em humano em 2014, no estado do Piauí. Foi realizado um estudo epidemiológico que resultou no primeiro registro da ocorrência de aves silvestres de vida livre infectadas com o vírus do Nilo Ocidental (VNO), no Brasil, na região onde ocorreu o caso humano da doença. O segundo estudo se refere a um fenômeno de mortandade de aves silvestres, frequentadoras de ambientes úmidos, que morreram por uma causa não identificada, nas margens do Lago de Sobradinho, localizado no Rio São Francisco, no Município de Remanso/BA. Os fenômenos de mortandades ocorreram no período de seca prolongada nos anos de 2008, 2010, 2013 e 2014. Dentre as mortes ocorridas, 16 espécies de aves aquáticas foram afetadas, principalmente representantes da família *Anatidae* (50,0%), *Ardeidae* (12,5%). Os marrecos (*Dendrocygna autumnalis*) e (*Dendrocygna viduata*) foram as aves mais afetadas correspondendo a 60,7% (164/270) das mortes. Este foi o primeiro registro, no Brasil, de intoxicação por toxina botulínica em aves silvestres de vida livre.

PALAVRAS-CHAVE: Ecoepidemiologia, *Clostridium botulinum*, botulismo, zoonoses, flavivírus, vírus do Nilo Ocidental no Brasil.

ABSTRACT

Several health afflictions of wild and domestic bird species represent risks to human health. Emerging diseases or others rarely recorded in the literature deserve attention given the difficulties in diagnosing them correctly, a result of the unpreparedness of professionals in recognizing symptoms and clinical signs in a timely manner for treatment both in humans and in animals. The current study is dedicated to examining two diseases not yet described in the circumstances in which they occur in Brazil. The first study examines West Nile Fever (WNF), with its first occurrence recorded in a human being in 2014 in the state of Piauí. An epidemiological study was performed which resulted in the first register of the occurrence in free wild bird species infected with the West Nile Virus (WNV) in Brazil in the same region where the first human case of the disease occurred. The second study reports on the mortality phenomenon of wild bird species which frequent humid environments and which died from non-identified causes along the shores of the Sobradinho Lake, located on the São Francisco River in the municipality of Remanso in the state of Bahia. The phenomenon of mortality occurred during the prolonged dry season in the years of 2008, 2010, 2013 and 2014. Among the deaths that occurred there were 16 species of aquatic birds, mainly representatives of the *Anatidae* (50.0%), and *Ardeidae* (12.5%) families. The *Dendrocygna autumnalis* and *Dendrocygna viduata* were the most affected birds corresponding to 60.7% (164/270) of the deaths. This was the first register in Brazil of intoxication in free wild bird species with the botulinum toxin.

KEY WORDS: Eco-epidemiology *Clostridium botulinum*, botulism, zoonoses, flavivirus, West Nile Virus in Brazil.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A tese aborda a exposição sobre dois temas, a Febre do Nilo ocidental e o botulismo, ambos relacionados às aves silvestres de vida livre, fornecendo conhecimento imprescindível para a compreensão da importância dos resultados dos dois estudos, abordados nos capítulos I e II, intitulados: “Evidência sorológica de infecção prévia por arbovírus em aves silvestres da área de registro do primeiro caso humano de encefalite pelo vírus do Oeste do Nilo no Brasil” e “Epizootia em aves silvestres de ambiente aquático causado por *Clostridium botulinum*, Brasil”. Os resultados dos estudos apresentados em ambos os capítulos representam os primeiros registros no Brasil.

1.1 Vírus do Nilo Ocidental – VNO

O vírus do Nilo Ocidental (VNO) pertence à família dos flavivírus que são conhecidos por causar doenças em humanos, sendo transmitidos por picadas de mosquitos infectados com o vírus. O ciclo de vida do VNO envolve a transmissão do vírus entre animais e humanos por meio dos mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles*. A partir de 2007, o VNO foi isolado em 61 espécies de mosquitos, bem como, em mais de 1.300 espécies de aves e 130 espécies de vertebrados não-aves (GUBLER, 2007), que incluem roedores, morcegos, caninos, felinos, ungulados, camelídeos, répteis, equinos e humanos (HUBALEK; HALOUZKA, 1991; GUBLER, 2007). Algumas espécies de répteis podem ser infectadas pelo VNO, como o jacaré americano (*Alligator mississippiensis*), crocodilo do nilo (*Crocodylu niloticus*), lagarto monitor (*Varano* sp.) e iguana verde (*Iguana iguana*) (STEINMAN et al., 2003).

Em animais domésticos, sinais clínicos de infecção por VNO só foram observados em cavalos, embora a maioria das infecções sejam assintomáticas também nestes animais.. As aves selvagens são, aparentemente, os reservatórios ideais para abrigar e replicar o vírus (MCLEAN, 2006).

O VNO está relacionado aos vírus da encefalite japonesa (JEV) do Velho Mundo e encefalite de St. Louis (SLE) vírus do Novo Mundo. Além disso, VNO reage de forma cruzada numa variedade de ensaios sorológicos, incluindo PRNT (Teste de Neutralização por Redução de Placas), com encefalite de Murray Valley (MVE), vírus Usutu (USUV), Kunjin (KUNV), Kokobera (KOKV), Stratford (STRV) e Alfuy (ALFV). A reação cruzada (RC) do VNO com SLE foi reportada em Nova Iorque, onde inicialmente o VNO foi confundido o com vírus SLE.

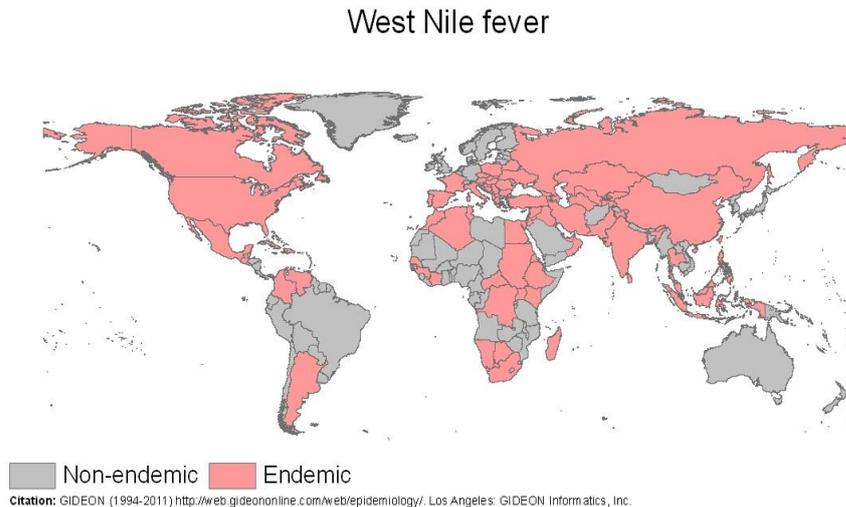
Ensaio adicionais utilizando análise direta da sequência do gene do vírus de Nova Iorque identificaram-no como um VNO, semelhante ao SLE (DAY; TABACHNICK, 1999).

O VNO é representado por pelo menos dois grupos antigênicos distintos. Um deles, o grupo Oriental Africano, contém VNO isolado do Congo, Egito, Israel, Uganda, África do Sul, Paquistão, França e Europa Oriental. O segundo grupo antigênico contém VNO isolado da Índia e da África do Sul. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1937 a partir do sangue periférico de uma mulher na província a oeste do rio Nilo em Uganda, na África Central (SMITHBURN et al., 1940). As primeiras epidemias causadas por VNO relatadas ocorreram em Israel em 1950, a primeira envolveu mais de 500 casos clínicos. Epidemias adicionais foram notificadas em Israel em 1951-1952, 1957 e 1962 (MANN et al., 2013).

O VNO não foi considerado, por longo tempo, como um agente patogênico humano significativo, pois a maioria das infecções tinha sido associada com infecções assintomáticas ou doenças febris leves (HAYES; MONATH, 1989), até que o VNO foi associado às epidemias ocorridas em 1956 (TAYLOR et al., 1956). Nos anos seguintes, o VNO foi identificado em surtos esporádicos da doença em humanos em diversas regiões na África, Oriente Médio, Índia, Europa e Ásia (HUBALEK et al., 1999). Em meados da década de 1990, os surtos ocorreram com maior frequência na bacia do Mediterrâneo e grandes surtos ocorreram, também, na Romênia e no delta do Volga, no sul da Rússia (HAYES et al., 2005). Desde então houve relatos sobre o VNO no norte da África (Egito e Israel), Leste, África Central e África do Sul, Ásia (Índia e Paquistão), Bornéu e Europa (Chipre e França). Infecções neurológicas foram relatadas nas áreas mais baixas do vale do Danúbio e em Bucareste na Romênia (TSAI et al., 1998). Os surtos de VNO em humanos e animais, com distúrbios neurológicos, foram relatados no velho mundo, alertando para a mudança do impacto da infecção por VNO na saúde pública e animal (TBER, 1996; PLATONOV et al., 2011). Em 1999 o vírus migra para os EUA (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004) e em 2001, o VNO se dispersa para a América Central e Caribe. Em 2003, o VNO passa a ser detectado em extensas áreas da América Central, incluindo 22 estados do México (ULLOA et al., 2003), Cuba (PUPO et al., 2006), Porto Rico (TORRES APONTE et al., 2008), El Salvador (CRUZ et al., 2005) nas Bahamas em 2003, e no Haiti, em setembro de 2004 (BEATTY et al. 2007). Proseguindo sua expansão dos EUA para os países da América do Sul, o VNO passa a ser detectado, primeiramente em equinos, no norte da América do Sul, na Colômbia (MATTAR et al., 2005) e na Venezuela, em 2004 (BOSCH e al., 2007). O VNO chega à Argentina em 2005, com casos registrados em equinos

e aves (DIAZ et al., 2008), como apresentado na Figura 1.

Figura 1. A dispersão do VNO no mundo de 1994 a 2011.



Fonte: Site Fundacionio. jun,2015 < <http://fundacionio.org/viajar/img/west%20nile%20virus%20world%20map.jpg>>

Nos seres humanos, as infecções com VNO podem ser subclínicas ou apresentar sintomas clínicos, variando entre febre temporária até encefalite grave. A doença pode ser grave em idosos, mas é geralmente leve em adultos saudáveis e crianças. O período de incubação para VNO é de três a seis dias. O início dos sintomas da doença é geralmente repentino, começando com uma febre elevada sustentada. Sintomas clínicos podem incluir dor de cabeça severa; uma erupção cutânea, geralmente no tronco e inchaço dos gânglios linfáticos. Os sintomas da infecção por VNO também podem incluir dores nos olhos, nos músculos e nas costas e problemas gastrointestinais. Em casos graves, muitas vezes há sintomas de encefalite com eventual envolvimento neurológico e às vezes morte. Os seres humanos experimentam uma viremia de baixo nível que dura cerca de seis dias. As taxas de mortalidade em seres humanos variam de 5 a 13% (DAY; TABACHNICK, 1999).

O VNO provoca manifestações graves em aproximadamente 1,0% das pessoas infectadas, com o aumento da morbidade e letalidade em indivíduos com mais de 50 anos (CDC, 2001; ZEINAD et al., 2004).

A transmissão horizontal do VNO foi demonstrada em algumas espécies de aves, incluindo gaio-azul (*Cyanocitta cristata*), pega-rabuda (*Pica pica*), gaivota-de-bico-riscado (*Larus delawarensis*), corvo-americano (*Corvus brachyrhynchus*) e ganso-comum-ocidental (*Anser*

anser). Infecções adquiridas através do consumo de tecidos infectados foram relatadas em aves, mamíferos e répteis (GLAZER, 2004). A Figura 2 ilustra duas espécies de relevância para a propagação do VNO, inclusive através da transmissão horizontal.

Figura 2. Gaio-azul (*Cyanocitta cristata*) (esquerda) e corvo-americano (*Corvus sp*) (direita), espécies capazes de propagar o VNO por transmissão horizontal.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

A descoberta de novos mecanismos de infecção e transmissão do vírus, como a ingestão de tecidos de animais infectados (Figura 3), órgão transplantados, transfusões de sangue, transmissão intrauterina, resultou na necessidade de uma reavaliação da importância do VNO para a saúde pública (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004; CDC, 2007).

Figura 3. Esconderijo de folhas e caçador (esquerda). A direita, Pombas-de-bando (*Zenaida auriculata*) mortas. Espécie migratória que utiliza o Bioma Caatinga, Nordeste do Brasil, no seu trajeto de migração. As pombas são abatidas quando tentam beber água, 2014.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Uma linhagem virulenta (cepa 1) do VNO identificada no ano de 1998 em cegonhas e gansos domésticos em Israel, causou infecções fatais em seres humanos em Israel (LANCIOTTI et al., 2002). Essa cepa foi responsável, também pelas ocorrências de pandemias

da FNO registradas na Europa, em 1999. Na mesma época o VNO migra para os EUA (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004). Desde então vários surtos de FNO foram registrados, com ocorrência de encefalite em humanos, equinos e elevada mortandade de aves silvestres (CDC, 1999).

Em Nova Iorque, EUA, em 1999, ocorreram os primeiros casos humanos (NASH et al., 2001). Em pacientes internados na cidade de Nova Iorque foram relatadas sequelas neurológicas do VNO, incluindo fraqueza muscular grave, e aproximadamente 10,0% dos pacientes desenvolveram uma paralisia flácida completa (CDC, 2001; LYLE et al., 2013). O VNO tornou-se endêmico nos EUA, com 16.196 casos de doença neuroinvasiva em humanos e 1.549 mortes desde 1999 (LYLE et al., 2013). VNO tornou-se enzoótico em todos os 48 estados americanos contíguos e evidências de transmissão para seres humanos, mosquitos, pássaros, cavalos ou outros mamíferos foram relatados em 96,0% dos condados. A ampla distribuição do VNO nos EUA é atribuída a capacidade do vírus se estabelecer e persistir nos diferentes ecossistemas presentes no país. VNO foi detectado em 65 espécies de mosquitos nos EUA (CDC, 2012), embora pareça que apenas algumas espécies do gênero *Culex* estejam envolvidos na transmissão epizootica e epidêmica do vírus. Os vetores mais importantes são *C. pipiens* no centro-norte do país, *C. quinquefasciatus* nos estados do sul, e *C. tarsalis* nos estados ocidentais onde se sobrepõe com a *C. quinquefasciatus* (KILPATRICK et al., 2006a; GODSEY et al., 2012). No entanto, a estrutura da população de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* é mais complexa. Como estas espécies hibridizam produzem uma zona híbrida estável através dos Estados Unidos. Barr (1957) define os limites da zona híbrida em 36° S e 39° N com base em medições da genitália masculina dos mosquitos. Trabalho utilizando microssatélites subsequentes (SAVAGE; KOTHERA, 2012; KOTHERA et al., 2013) e outros marcadores moleculares (HUANG et al., 2011), indicam que a zona híbrida se estende mais para o norte e sul do que o sugerido por Barr (1957). Nas latitudes médias dos EUA, ambas as espécies nominais e híbridas podem estar presentes e são comumente relatadas como *C. pipiens* complexo (SAVAGE et al., 2007; SAVAGE; KOTHERA, 2012).

O mecanismo pelo qual o VNO foi introduzido em Nova Iorque é controverso. É possível que VNO fosse mantido em ciclos de transmissão de baixo nível no nordeste dos EUA por muitos anos e só se tornou evidente durante o verão e início do outono de 1999. Este aumento de atividade epidêmica pode ser atribuído às condições ambientais propícias, na área de Nova Iorque, para a transmissão epidêmica. Epidemias urbanas de LES (encefalite de St.

Louis) na América do Norte têm ocorrido durante os verões extremamente secos, condições como as que existiam em Nova Iorque durante o verão de 1999. Outra forma de introdução do VNO em Nova Iorque pode ter ocorrido por meio da entrada nos EUA de uma pessoa infectada proveniente da África, Europa Oriental ou outra região com transmissão ativa do vírus. Se a viremia de um indivíduo é alta o suficiente para infectar mosquitos vetores (*C. pipiens* em Nova Iorque) nos mosquitos infectados o vírus passa por um período de incubação de pelo menos duas semanas, antes que se tornem infectantes. O vírus se replica no tecido dos vetores durante o período quente, eventualmente infecta a maioria dos órgãos internos, incluindo as glândulas salivares, passando a transmitir o vírus durante o repasto sanguíneo.

Outra possibilidade de introdução do VNO em Nova Iorque pode ter ocorrido pela importação de pássaros infectados. Aves legalmente importadas são colocadas em quarentena durante pelo menos 30 dias. Isso deve garantir que as aves infectadas não entrem em contato com vetores artrópodes. Aves ilegalmente importadas não são colocadas em quarentena e pode ter sido uma fonte de infecção dos mosquitos pelo vírus. Carrapatos infectados ou mosquitos infectados podem ter vindo, acidentalmente, em voo aéreo internacional. Ninfas infectadas ou adultas de carrapatos nos corpos de humanos e animais que ingressaram no país, também poderiam estar infectadas, posteriormente, dando início ao ciclo de transmissão do VNO em Nova Iorque (DAY; TABACHNICK, 1999). Finalmente, o vírus pode ter sido liberado acidentalmente a partir de uma experiência científica legítima ou de forma proposital como um ato bioterrorista. A liberação acidental ou proposital de qualquer agente patogênico transmitido por mosquitos, para que desencadeie um surto em humanos, depende de condições ambientais favoráveis para a amplificação do vírus em vertebrados hospedeiros e transmissão por vetores adequados (DAY; TABACHNICK, 1999).

VNO possui perfis distintos de RNA. Estes perfis são, por vezes, bastante específicos e dependentes da localização geográfica original do vírus. Estudos recentes têm caracterizado os perfis de RNA de VNO, incluindo vários isolados provenientes do surto em Nova Iorque. Os resultados mostram que todos os isolados de VNO de Nova Iorque eram praticamente idênticos. Todos os vírus isolados em Nova Iorque possuem estreita afinidade com um VNO isolado em Israel em 1998 (LYLE et al., 2013). A constatação de que há apenas uma estirpe genética de VNO na América do Norte aponta para a possibilidade de que o vírus foi introduzido recentemente na América do Norte, sem ter tido tempo suficiente para o surgimento de mutações.

Embora estudos tenham identificado *Turdus migratorius*, como o principal reservatório para a transmissão do VNO na América do Norte (KILPATRICK et al., 2006a), estudos experimentais e evidências indiretas sugerem que o rabo-de-quilha (*Quiscalus quiscula*), uma espécie migratória, cuja rota de migração inclui a maior parte da América do Norte a leste das montanhas rochosas e ao sul da baía de Hudson, pode ter sido o principal agente para a dispersão epidêmica do VNO na América do Norte em 2002 (Figura 4).

Figura 4. *Turdus migratorius* (esquerda), principal reservatório no ciclo de transmissão da FNO e *Quiscalus quiscula* (direita), responsável pela dispersão explosiva da epidemia da FNO na América do Norte.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Nas áreas de reprodução de *Q. quiscula* nos EUA houve elevado registro do VNO. Muitas espécies de aves migratórias na América do Norte são conhecidas pela alta susceptibilidade ao VNO, contribuindo para a ampliação e dispersão do vírus na América do Norte, além de parecerem estarem associadas à dispersão do VNO por longas distâncias. Históricos de elevadas taxas de morbidade e mortalidade geralmente estão associados às espécies de aves passeriformes, especialmente corvídeos (corvos, jays, gralhas, etc.).

Infecções fatais também foram relatadas entre aves díspares, incluindo aves de rapina (corujas, gaviões), flamingos, papagaios, gaivotas e gansos. No entanto a proliferação iniciou na cidade de Nova Iorque em área metropolitana em áreas próximas do leste da América do Norte durante 1999-2000 mediada por corvos-americanos (*Corvus brachyrhynchos*), e subsequente dispersão no sudeste na Flórida e na região da Costa do Golfo, por passeriformes migratórios, por exemplo: *C. cristata*, *T. migratorius*, *Q. quiscula*, e redistribuição e proliferação subsequente do norte para o ocidente por outros passeriformes migrantes e não migrantes.

Em 2001, o vírus migra dos EUA para a América Central, e Caribe. Em 2003, casos de FNO foram registrados em extensa área da América Central, incluindo 22 estados no México (ULLOA et al., 2003), Belize e Guatemala. O primeiro caso de FNO em aves silvestres no México foi registrado em 2003, em Tabasco (sudeste do país), o vírus foi isolado em amostra de carcaça de um corvo comum (*Corvus corax*) (ESTRADA-FRANCO et al., 2003). Nos Estados Unidos e no Canadá, as taxas de morbidade e mortalidade por infecção pelo VNO são elevadas em humanos, cavalos e aves; no México e em outras regiões da América Latina, os impactos dessa zoonose na saúde ainda são pouco estudados (BOSCH et al., 2007).

No México o número de casos humanos e em animais (equídeos e aves) de FNO é baixo. Esse fato pode ser atribuído a múltiplos fatores envolvidos na ecologia do vírus. As interações de hospedeiros amplificadores, vetores do VNO no México, combinadas com fatores como o clima e habitat, bem como, a circulação de outras espécies de flavivírus, pode resultar em níveis relativamente baixos de transmissão e desenvolvimento da doença. Interações vírus-hospedeiro no México, incluindo a susceptibilidade e a competência dos possíveis hospedeiros e amplificadores, são ainda pouco estudadas.

A avaliação da resposta de várias espécies de aves à infecção por VNO poderia elucidar aspectos do ciclo de transmissão em ecossistemas tropicais e fornecer informações para potenciais estratégias de vigilância. No Caribe, VNO foi detectado em Cuba (PUPO et al., 2006), Porto Rico, (TORRES APONTE et al., 2008), El Salvador (CRUZ et al., 2005) nas Bahamas em 2003, e Haiti, em setembro de 2004 (BEATTY et al. 2007).

Na Venezuela foi detectado o VNO em duas espécies de passeriformes (*Turdus leucomelas* e *Coereba flaveola*) e em galinha doméstica (*G. gallus*) (BOSCH et al., 2007); a presença do VNO na espécie *Coereba flaveola* (Cebinho) também foi relatado nas ilhas do Caribe (DUPUIS et al., 2005). A Figura 5 ilustra duas espécies que foram soropositivas para o VNO na Venezuela e Caribe.

Figura 5. *Coereba flaveola* (esquerda) e *Turdus leucomelas* (direita), espécies que apresentaram sorologia positiva para o VNO na Venezuela e no Caribe.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Um suposto caso humano de FNO no Uruguai em 2004 pode ser resultado de infecção ocorrida quando da visita deste humano aos Estados Unidos (PROMED, 2004). Outros países têm relatado infecções por VNO em viajantes retornando dos EUA, Canadá, República Checa, Dinamarca, França, Alemanha e Holanda (HUBALEK et al., 2006).

O VNO chega à Argentina em 2005, com registro de casos em equinos e aves (DIAZ et al., 2008), seguidos do primeiro caso humano conhecido de encefalite por VNO ocorrido em 2006, e casos humanos adicionais registrados em 2007 (MORALES et al., 2006; DIAZ et al., 2008). Evidência sorológica da circulação do VNO em cavalos foi detectada em Santa Fé, Buenos Aires, Corrientes e nas províncias de Córdoba na Argentina. Em 2005, o vírus foi isolado de cavalos mortos e aves nas regiões norte e central da Argentina (MORALES et al., 2006). Na Argentina, patos (Anatidae: *Dendrocygna bicolor*) e galeirões (Rallidae: *Fulica leucoptera*) foram detectados soropositivos para VNO (ARTSOB et al., 2009). Ainda na Argentina, as espécies de aves *Zenaida auriculata* e *Columbina picui* mostram-se boas amplificadoras do VNO (DIAZ et al., 2011) (Figura. 6).

Figura 6. Espécies que apresentaram indivíduos soropositivos para VNO na Argentina: *Dendrocygna bicolor* (1), *Zenaida auriculata* (2) e *Columbina picui* (3)



(1)



(2)



(3)

Fotos: Pedro Cerqueira Lima

A constatação do VNO no gênero *Turdus ssp.* no Caribe e América do Sul, contribuiu para identificar este gênero como reservatório amplificador e importante dispersor do VNO, análogo aos seus congêneres na América do Norte, como o Tordo-americano (*Turdus migratorius*) que contribuiu na disseminação do VNO na região (KOMAR et al., 2003; KILPATRICK et al., 2006a).

Até o momento, a FNO foi detectada em poucas espécies de aves na América do Sul, em relação ao número de espécies de aves residentes e exóticas infectadas pelo VNO registrado na América do Norte e Caribe, que abrangeu mais de 300 espécies (GUBLER, 2007). Várias espécies de aves, mesmo com alta carga de VNO, não desenvolvem a doença grave ou fatal e são capazes de migrar quando infectadas (RAPPOLE; HUBALEK, 2003). Infecções experimentais com aves migratórias tem mostrado que o VNO não inibe a migração (OWEN et al., 2006).

A vigilância para o VNO em áreas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul se torna mais complexa em vista da presença de outras espécies de flavivírus enzoóticos/endêmicos, especialmente SLE e DENV, e pela dificuldade de um diagnóstico preciso e a diferenciação entre os quadros clínicos em humanos infectados por esses vírus estreitamente relacionados, inclusive ao ponto dos anticorpos poderem ser parcialmente protetor contra a infecção por VNO, o que pode explicar a pouca gravidade da doença clínica nessas regiões (GUBLER, 2007).

Dentro da diversidade de espécies de aves nas regiões tropicais existem aquelas espécies que não são boas amplificadoras do VNO, portanto oferecem menor risco de infecção dos vetores que se alimentarem dessas aves infectadas, o que reduz a probabilidade de uma grande acumulação de vírus nas populações vetoradas e de aves hospedeiras, diminuindo a chance de ocorrência de surtos em humanos (ARTSOB et al., 2009).

Uma segunda hipótese para tentar explicar por que humanos e equinos infectados por VNO não desenvolvem a doença neurológica grave em áreas tropicais, diz respeito a possível ocorrência de imunidade cruzada pela presença de anticorpos decorrentes da infecção por outros flavivírus geneticamente próximos ao VNO.

Existem diversas espécies de flavivírus endêmicas ou enzoóticas no Caribe, América Central e América do Sul, incluindo o vírus da dengue (SLEV), o vírus da febre amarela (YF), vírus Ilhéus (ILHV), vírus Rocio (ROCV), vírus Cacicaporé (CPCV), vírus Aroa (AROAV), vírus Naranjal (NJLV), vírus Bussuquara (BSQV) e vírus Iguape (IGUV) (SABATTINE et al., 1998; GUBLER, 2007). Alguns desses vírus são membros do sorogrupo JE (Sorogrupo vírus da encefalite japonesa): VNO, CPCV, MVEV, ILHV, SLEV, ROCV, KUNV, USUV, vírus Kokobera (KOKV). Existem evidências experimental que anticorpos de flavivírus heterotípicos podem modular ou regular negativamente a doença clínica e reduzir as cargas virais. Assim, é possível que os anticorpos dos flavivírus difundidos entre populações de aves silvestres/domésticas, de humanos e de outras espécies animais na América tropical regulem ou modulem a doença clínica e a viremia associada à infecção por VNO, reduzindo a transmissão (GUBLER, 2007).

Os níveis elevados de biodiversidade encontrados nas regiões Neotropicais contribuem para reduzir a transmissão do VNO (SWADDLE; CALOS, 2008). No entanto, nas áreas urbanas a biodiversidade ocorre pela colonização por várias espécies de aves competentes para amplificar o VNO, como pardais de casa (*Passer domesticus*) e irauína-dos-paúis (*Quiscalus major*). A ausência de corvídeos nos peridomicílios das regiões neotropicais aparentemente contribui para reduzir o risco de infecção humana por VNO (REISEN et al., 2006).

Para investigar se a aparente baixa prevalência da FNO no México é consequência da reduzida virulência das cepas VNO circulantes no país, entre 2006-2008, foi realizada uma série de infecções experimentais por VNO em aves de várias espécies, potenciais hospedeiras e amplificadoras do VNO incluindo: galinhas (*G. gallus*), pombas (*Columba livia*), pardais

(*Passer domesticus*), tordos-cor-de-argila (*Turdus grayi*) e zanate-mexicano (*Quiscalus mexicanus*) Foi mensurada a viremia, excreção viral, as taxas de sobrevivência, tropismo tecidual e índice de competência como reservatório das aves inoculadas com cepas de VNO do sul do México (Tabasco) ou norte do México (Tecate).

Os títulos de viremia observados para galinhas e pombos adultos não atingiram níveis para infectar os mosquitos, mostrando que estas aves, pelo menos quando adultas, são reservatórios ineficientes para as duas cepas testadas. As outras três espécies de passeriformes testadas foram consideradas reservatórios competentes. No entanto é difícil comparar esses resultados com outros experimentos, em vista da variação das espécies testadas, cepas utilizadas e via de inoculação (agulha x vetor). Apesar disso, a competência observada do *Q. mexicanus* para a cepa Tabasco do VNO é quase tão alta quanto ou maior do que a observada para qualquer espécie, independentemente do método de inoculação (KILPATRICK et al., 2006a). Esta espécie parece ter uma importância expressiva como reservatório e dispersor do VNO, a partir das planícies centrais dos Estados Unidos, sul do México, América Central e Colômbia. A Figura 7, apresentada abaixo, mostra o mapa de distribuição do *Quiscalus mexicanus* nas Américas.

Figura 7. Mapa de distribuição do Zanate-mexicano (*Quiscalus mexicanus*).



No Brasil, em fevereiro de 2009, amostras de mosquitos, de sangue de cavalos e filhotes de jacaré de vida livre foram coletadas em seis fazendas de gado na região do Pantanal (18°20'19"40'S e 57°14'55"00'W) durante a estação chuvosa, resultando em cinco cavalos soropositivos para VNO, sendo este o primeiro caso confirmado da circulação do VNO no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011).

Ometto et al. (2013) realizaram um inquérito sorológico em 678 equídeos (517 cavalos, 156 mulas e cinco burros), entre 2002 e 2009, e 478 aves, amostradas entre 2008 e 2010, em todos os biomas brasileiros (Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Pantanal e o Pampa do Rio Grande do Sul). Resultando em cinco (1,05%) aves soropositivas no ELISA específico para VNO e 13 (1,9%) equídeos soropositivo nos mesmo testes. Os resultados do PRNT não confirmaram a soropositividade para o flavivirus nas cinco amostras positivas das aves, no entanto confirmou a positividade para os 13 equídeos.

A falta de evidência da FNO em aves no Brasil permanece intrigante porque várias espécies migratórias foram avaliadas e aves soropositivas foram predominantes nos últimos cinco anos em países vizinhos do Brasil (DIAZ et al., 2011). Infecções experimentais em várias espécies de aves indicaram que os níveis de viremia permanecem elevados durante curto período (máximo de sete dias), sugerindo que a introdução do VNO por aves migratórias de longa distância seja um evento improvável (KOOPMANS et al., 2007) e corroborando a hipótese que o vírus se espalha por meio de aves residentes ou aquelas que se deslocam em curta distância, propagando o vírus para o sul das Américas e não diretamente por aves migratórias da América do Norte.

Em relação aos seres humanos, no Brasil, há um intenso programa de vacinação para a febre amarela. Em vista do vírus ocorrer de forma endêmica no país, assim como os sub-tipos do vírus da dengue (DENV), e ambos os vírus podem conferir imunidade cruzada para outros flavivírus, o que pode resultar em manifestações sub-clínicas nos casos de infecção pelo VNO (OMETTO et al., 2013).

No Brasil, considerando a grande população de aves que podem agir como reservatórios, abundância e diversidade de espécies de mosquitos, é possível que o VNO pode ter se tornado endêmico em alguns estados. Conforme já descrito por Araujo et al. (2005), anualmente milhares de aves migratórias provenientes da costa leste dos Estados Unidos e Canadá chegam ao Brasil, entrando em contato com as aves silvestres residentes. Esse contado ocorre

principalmente nos locais de pouso e invernada, onde o risco de transmissão dos patógenos é mais elevado entre as espécies migratórias e as residentes, fato que reforça a necessidade de implantação de um sistema de vigilância sentinela nesses pontos, segundo normatização do Ministério da Saúde - MS (BRASIL, 2010).

Araujo et al., (2012) realizaram inquéritos utilizando teste de inibição de hemaglutinação (IH) e isolamento viral em Salinópolis/Pará, 229 aves foram capturadas em 2007 e 245 em 2008, entretanto, somente foram observados animais reagentes no ano de 2007. Não foi possível o isolamento de nenhum arbovírus nas amostras coletadas.

Através do teste de IH, foi identificada a presença de anticorpos para alfavírus, flavivírus e bunyavírus. Algumas espécies de aves, como o maçarico-miúdo (*Calidris pusilla*), vira-pedra-ferrugem (*Arenaria interpres*) e a batuíra-cinzenta (*Pluvialis squatarola*), mostraram maior capacidade de amplificação de alguns arbovírus. Quando considerado o status das aves, 85,2% das reações positivas eram provenientes de aves migratórias e somente 14,8% de residentes. Considerando os alfavírus, a espécie *P. squatarola* apresentou 28,6% de positividade, seguida da *A. interpres* com 11,8%. As duas espécies são migratórias, dificultando a determinação do local provável de infecção. Para os flavivírus, somente as espécies trinta-réis-anão (*Sterna superciliaris*) e a *C. pusilla* foram reagentes, sendo que a primeira tem o status de residente. Considerando os bunyavírus, *A. interpres* foi reagente para o vírus Oropouche (OROV), seguida do maçarico-de-asa-branca (*Charadrius semipalmatus*), maçariquinho (*Calidris minutilla*), maçarico-pintado (*Actitis macularius*) e *C. pusilla*. Por esse vírus ser endêmico na região do estudo e não estar presente no hemisfério norte, de onde migram as espécies reagentes, pondera-se que as mesmas tenham se infectado na área, corroborando com o que já foi descrito por (VASCONCELOS et al., 1998). Observou-se que os indivíduos que foram reagentes para um vírus de um grupo não foram reagentes para outro vírus do mesmo grupo. Assim, o presente estudo confirma relato feito por Charles H. et al. (1989) e Degallier et al. (1992), segundo os quais os grupos de aves de uma mesma espécie raramente contam com mais de uma espécie de vírus pertencente ao mesmo grupo viral, e isso se deve à competitividade existente entre os vírus de um mesmo grupo, neste estudo não foi detectado a presença do VNO.

Em agosto de 2014, um trabalhador rural de Aroeiras do Itaim município do estado do Piauí no Brasil, foi admitido no Instituto Natan Portella para Doenças Tropicais (Teresina,

Estado do Piauí, Brasil), com sintomas clínicos de encefalite aguda. Foi enviada amostra de sangue, líquido cefalorraquidiano e fezes, desse indivíduo, para o Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará, Brasil), na tentativa de detectar herpes vírus, enterovírus e arboviroses. Em Novembro de 2014 foram divulgados os resultados dos exames do indivíduo, que confirmaram o primeiro caso de FNO para o Brasil (VIEIRA et al., 2015) (Figura 8).

Figura 8. Trabalhador rural, no estado do Piauí foi o primeiro caso humano de FNO no Brasil, 2014. O quadro clínico apresentou fraqueza muscular grave e paralisia flácida completa, que impossibilitava a locomoção.



Fonte: Pedro Cerqueira Lima

Em relação a este caso humano de FNO, a equipe envolvida na vigilância epidemiológica do estado do Piauí trabalha com a hipótese da existência de uma endemia silenciosa de FNO no estado e, talvez, no âmbito nacional. Os quadros clínicos de encefalite causados por diferentes espécies de vírus e outros agentes não virais podem apresentar sinais e sintomas coincidentes. A suposição clássica da natureza herpética de encefalite viral, a falta de terapias específicas contra a maioria dos vírus, bem com a falta de métodos de diagnóstico na maioria dos hospitais brasileiros são fatores que, combinados, contribuem para o não reconhecimento dos agentes etiológicos envolvidos nas infecções do sistema nervoso central. Estas afirmações podem indicar que outros casos de encefalite por VNO podem ter ocorrido sem o reconhecimento clínico da doença e sem a realização dos testes necessários à identificação do agente etiológico. Clínicos brasileiros, pesquisadores e epidemiologistas têm um desafio pela frente, uma vez que o esclarecimento sobre o estado atual de circulação do VNO (possíveis vetores, reservatórios silvestres residentes, prevalência/incidência) tem relevância epidemiológica para o Brasil.

1.2 Botulismo

O botulismo é uma doença de baixa ocorrência e de alta letalidade, tendo ocorrência mundial e normalmente está relacionada às conservas de alimentos caseiras contendo vegetais ou carnes. É causada pela bactéria *Clostridium botulinum*, bacilos gram-positivos anaeróbicos, que podem se apresentar na forma esporulada e produzem a toxina botulínica, considerada a substância mais tóxica conhecida (SCHIAVO et al., 2000).

O *C. botulinum* é uma bactéria cujo habitat natural é o solo, com destaque ao solo na forma de lama, onde a atividade de produção de toxina parece ser mais elevada (SCHIAVO et al., 2000). Diversos autores descrevem fatores ambientais que favorecem a proliferação do *C. botulinum* e o aumento da produção e concentração da toxina botulínica no meio: ausência de chuva (períodos de seca) com progressiva deterioração dos ambientes aquáticos, com águas rasas, estagnadas, pH alcalino, diminuição do oxigênio dissolvido/anaerobiose, abundância de invertebrados aquáticos e de matéria orgânica em decomposição (SMITH, 1976; ROCKE; SAMUEL, 1999; YULE et al., 2006; DEFILIPPO et al., 2013; WŁODARCZYK et al., 2014)

A atividade humana também pode aumentar o substrato disponível para a produção da toxina em áreas úmidas. Por exemplo, drenagem de pântanos, pesticidas e outros poluentes agrícolas pode matar a vida aquática, proporcionando assim mais substrato para a produção de toxina. Esgoto bruto e vegetação apodrecida são outras potenciais fontes de substrato. Embora a maioria das aves aquáticas não vá consumir diretamente uma carcaça de animal vertebrado, elas vão ingerir as larvas de insetos presentes nas carcaças. Desta forma, os surtos de botulismo podem se perpetuar (YULE et al., 2006) (Fig. 9).

Figura 9. Carcaças de aves dispostas nas margens de lago da Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia/Brasil, 2008



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

A fonte da toxina botulínica é difícil de ser identificada; a toxina pode entrar no ambiente por causa de vários fatores contribuintes, destacando-se carcaças de vertebrados que podem desempenhar um papel impactante importante, fornecendo um substrato adequado para o crescimento de *C. botulinum* (DEFILIPPO et al., 2013).

O botulismo é uma doença tipicamente de beira d'água, raramente aves doentes ou mortas são encontradas distantes da borda da vegetação que marca o nível original da água antes do recuo em decorrência de uma eventual seca. Varias carcaças de aves depositadas nas proximidades das margens, quando se observa a redução do nível da lâmina d'água em períodos de seca, geralmente tipificam o aparecimento de grandes surtos da doença (Fig. 10).

Figura 10. Aves aquáticas, encontradas debilitadas na borda de um pequeno lago adjacente à Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia, Brasil, 2008.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Em represamentos onde os níveis de água são relativamente estáveis, aves afetadas podem ser encontradas em áreas de vegetação inundada (Fig. 11). Aves afetadas pelo botulismo também tendem a se reunir ao longo de penínsulas e ilhas de vegetação (YULE et al., 2006).

Figura 11. *Dendrocygna viduata*, representante da família *Anatidae*, encontrado debilitado em uma ilha de vegetação na Represa de Sobradinho, Remanso, Bahia, Brasil (foto esquerda), 2008.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

O botulismo é considerada uma doença paralítica (SMITH, 1976) causa paralisia dos músculos e do diafragma que pode impedir a respiração, causando insuficiência respiratória e a morte em seres humanos, aves e outros animais (DUNCAN; JENSEN, 1976). O botulismo causa também paralisia da pálpebra interna dos animais (Fig. 12).

A morte das aves em ambiente aquático se dá em virtude da paralisia flácida do músculo do pescoço que impede que as aves mantenham a cabeça fora da água levando à morte por afogamento (Fig. 13) (HANNETT et al., 2011). Estes são os dois sinais de botulismo aviários mais facilmente reconhecidos. Quando as aves chegam nessa fase, muitas vezes se afogam antes de morrerem de insuficiência respiratória causada pela toxina botulínica (YULE et al., 2006).

Figura 12. *Netta erythrophthalma*, com paralisia da pálpebra interna, ou membrana nictitante encontrada na borda da Barragem de Sobradinho/BA, 2008.



Foto: Pedro Cerqueira Lima

Figura 13. *Dendrocygna viduata*, prestes a se afogar por causa da paralisia flácida dos músculos do pescoço, incapacitada de manter a cabeça ereta, em virtude do botulismo, 2008.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Dependendo da quantidade de toxina ingerida, e a susceptibilidade das espécies, o sinal de botulismo em aves aquáticas pode progredir de uma ligeira dificuldade para alçar voo a uma completa paralisia flácida dos membros e pescoço, seguido por crise respiratória aguda sofrimento e morte (JOHNSON; MONTECUCCO, 2008).

O *C. botulinum* é dividido em sete sorotipos, de A a G, com base na especificidade sorológica da toxina produzida (AUSTIN, 2001). Em humanos os tipos A, B, E e F são responsáveis por causar a doença e os tipos C, e D afetam principalmente animais (HEDELAND et al., 2011). A ocorrência do sorotipo E pode estar associada, entre outros, à presença de peixes em decomposição, favorecendo a proliferação do *C. botulinum* e a produção desse tipo de neurotoxina (CANN; TAYLOR, 1982). O acúmulo de peixes mortos no fundo de lagos pode se tornar uma fonte significativa de botulismo tipo E. Invertebrados também podem desempenhar importante papel com vetores, transportando a toxina tipo E, como já demonstrado em caracóis, minhocas e pequenos nematoídes (HUSS; ESKILDSEN, 1974; YULE et al., 2006).

Casos humanos de botulismo tipo E, também, têm sido associados ao consumo de peixes, outros organismos aquáticos e mamíferos (COLLINS; EAST, 1998; HAUSCHILD; DODDS, 1993). Apesar de *C. botulinum* tipo E ter sido associado, quase exclusivamente, a ambientes aquáticos, surtos deste tipo de botulismo entre aves aquáticas selvagens e pássaros da costa são raros. Kaufmann & Fay (1964) relataram um surto de botulismo do tipo E entre mergulhões e gaivotas que se alimentavam de peixes no lago Michigan, em 1963. *C. botulinum* tipo E foi reportado no conteúdo intestinal de peixe retirados dos Grandes Lagos (BOTT et al., 1966), bem como, em peixes mortos recolhidos no Lago Michigan (MONHEIMER, 1968).

Surtos de botulismo na criação de peixes têm sido bem documentados (HUSS; ESKILDSEN, 1974; CANN; TAYLOR, 1982), apesar de que o conhecimento sobre sua toxicologia nessas espécies necessitar de maiores esclarecimentos (YULE et al., 2006).

As maiorias dos surtos de botulismo ocorrem durante o verão, quando as temperaturas são elevadas (YULE et al., 2006). Pesquisas realizadas na Índia detectaram *C. botulinum* em amostras de peixes crus em estabelecimentos varejistas de Cochin, onde foram detectadas toxinas dos tipos A e D com uma prevalência de 19,0% nos peixes comercializados. A incidência de *C. botulinum* em camarões foi de 25,0%. As toxinas dos tipos A e D foram prevalentes nos peixes frescos, e as dos tipos C e D foram predominantes nos produtos curados. Em camarão salgado desidratado, das 21 amostras analisadas, 48,0% (10/21) hospedavam a toxina botulínica do tipo D (LALITHA; SURENDRAN, 2002).

O botulismo provoca doença e mortalidade em aves silvestres (FORRESTER et al., 1980; WOBESER, 1997), com relatos em todo o mundo especialmente em aves aquáticas (*Anseriformes*): FORRESTER et al., 1980; SHAYEGANI et al., 1984 ;WOBESER, 1997), aves marinhas (*Charadriiformes*); FORRESTER et al., 1980), gaivotas (*Larus argentatus*): HANNETT et al., 2011), além de galinhas domésticas (*G. gallus*): DOHMS & CLOUD, 1982).

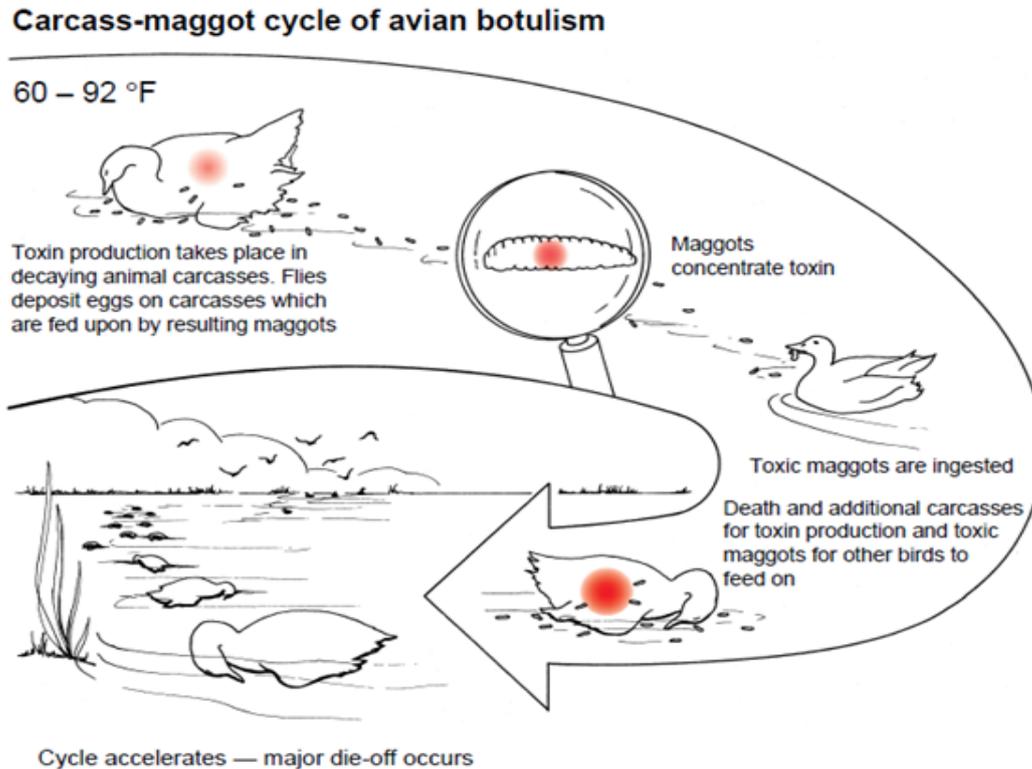
A detecção de *C. botulinum* em aves aquáticas e larvas de moscas (DEFILIPPO et al., 2013), bem como a presença de larvas no conteúdo do estômago de aves moribundas, é um forte indício de intoxicação de aves aquáticas (YULE et al., 2006). Mortandades de aves aquáticas geralmente são causadas pela toxina tipo C. Toxina botulínica tipo A também causam doença em pássaros, mais frequentemente nas galinhas domésticas.

Os tipos B, D, F e G ainda não foram detectados causando morte de aves na América do Norte (YULE et al., 2006). Os abutres são considerados exceção: eles são altamente resistentes à toxina do tipo C (ROCKE; FRIEND, 1999).

O comportamento de forrageamento é, provavelmente, o mais importante meio pelo qual a toxina botulínica ingressa no organismo animal. O ato de filtrar os alimentos e de mergulhar e revolver os substratos, observado em aves aquáticas e marinhas, parece estar entre as condições que colocam estas espécies como as de maior risco (Figura 15). Botulismo em aves aquáticas tem sido relatado na América do Norte, particularmente na Região Oeste, na América do Sul, Europa, Europa Central, África do Sul, Austrália e Japão (FORRESTER et al., 1980; SHAYEGANI et al., 1984; VIDAL et al., 2013).

A figura 14 apresenta o ciclo epidemiológico do botulismo em aves, a partir das larvas de insetos presentes em carcaças, assim como a sua ingestão pelas aves. A produção de toxinas ocorre em lugares que possuem carcaças de animais em decomposição. Moscas depositam seus ovos nessas carcaças, resultando em larvas, que concentram toxinas. As aves ingerem essas larvas como alimento, e acabam morrendo contaminadas pelas toxinas.

Figura 14. Ciclo epidemiológico do botulismo em aves, a partir das larvas de insetos presentes em carcaças e sua ingestão pelas aves



Fonte: Avian Botulism Tonie E. Rocke & Milton Friend (1999)

Mais de um milhão de mortes por botulismo aviário foram relatados em surtos relativamente localizadas em um único ano, e surtos com perdas de 50.000 ou mais aves são relativamente comuns. A nível mundial, o botulismo aviário é provavelmente a doença mais importante das aves migratórias (YULE et al., 2006).

Vários surtos de botulismo tipo C já ocorreram no estado de Nova Iorque, sendo que um deles matou mais de 8.000 faisões comuns (*Phasianus colchicus*) em uma fazenda de criação. Outro, envolvendo 1.200 patos, ocorreu em Ellicott Creek, na cidade de Amherst (Erie County, USA) onde aproximadamente de 95,0% destes eram patos selvagens e 5,0 % eram patos-carolino (*Aix sponsa*). Outro surto, envolvendo 1.500 patos selvagens e cerca de 100 pássaros da fauna costeira sendo a sua grande maioria maçarico-grande-de-perna-amarela (*Tringa melanoleuca*), ocorreu em outubro de 1982 em Oak Orchard e Tonawanda, áreas úmidas destinadas à conservação da vida silvestres e local de grande concentração de aves migratórias. A presença da toxina de *C. botulinum* no soro dos patos e nas larvas de moscas nesses surtos levou à suspeita de que os vermes na área poderiam ter sido contaminados com a

toxina botulínica. As larvas podem ter se alimentado dos cadáveres de aves ou outros animais que morreram por botulismo (SHAYEGANI et al., 1984).

Alguns surtos de botulismo aviários têm sido associados às rotas de migração de aves (YULE et al., 2006). Todos os anos, várias espécies de aves silvestres, em particular, o pato-real (*Anas platyrhynchos*), migram de outros países europeus para a Itália. A Itália hospeda patos selvagens provenientes de uma ampla área geográfica: Europa Central (Alemanha, Áustria, Polônia, República Checa, Suíça, Camargue francês, e Sul da Alemanha), Norte da Europa (Dinamarca, Suécia e Reino Unido) e Europa Oriental.

No Brasil o botulismo em bovinos é uma doença de grande importância devido ao seu impacto econômico/sanitário, podendo causar uma grande mortalidade de bovinos adultos. Surtos têm sido registrados nos últimos anos no Brasil, em extensas regiões do país acometendo, sobretudo fêmeas em gestação ou lactação, com a estimativa de centenas de milhares de mortes (DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA; DÖBEREINER, 1995). Bovinos de regiões geográficas com acentuada deficiência de fósforo no solo e na pastagem, tendem a buscar suprir este déficit, roendo ossos dos cadáveres de outros animais, principalmente rebanhos criados extensivamente a osteofagia, pode ser fonte contaminante da toxina botulínica (RIBAS et al., 1994; DUTRA; DÖBEREINER, 1995). Na África do Sul, Austrália e América do Sul, o botulismo tipo C está relacionado com o consumo de ossos e material de carcaça produzida pelo gado (osteofagia), resultante de deficiência de fósforo (KRICK et al., 1994), o botulismo também pode estar associado a alimentos contaminados e armazenados inadequadamente (DUTRA et al., 2001). Botulismo tipo C também tem sido associado com a adição de cama de frango contendo carcaças de frango para rações de gado (MCLOUGHLIN et al., 1988).

No Brasil são raros os estudos sobre o botulismo em aves silvestres, o primeiro relato ocorreu no final do verão de 2010, onde um surto de botulismo tipo C afetou as aves mantidas em um lago no Zoológico do Rio Grande do Sul. Um total de 14 aves representantes da família *Anatidae* (10 cisnes-pescoço-negro, *Cygnus melancoryphus*, três patos-do-mato, *Cairina moschata*; e uma marreca-caneleira, *Dendrocygna bicolor*) de um total de 100 aves morreram depois de apresentar paralisia muscular flácida, sinais característicos de dificuldade de locomoção, vôo, natação, pescoço caído e grave dispneia. No recinto foram encontradas carcaças de aves mortas (algumas infestadas por larvas de moscas sarcófagas).

O nível d'água da lagoa estava baixo, com reduzida concentração de oxigênio livre, muita matéria orgânica e lama. Os achados epidemiológicos e clínicos indicaram o diagnóstico de toxina do botulismo tipo C, que foi confirmado por bioensaio e soroneutralização (SN) (MCLOUGHLIN et al., 1988)., OLINDA et al. (2015) relatam um surto de botulismo tipo C em galinhas (*G. gallus domesticus*), patos (*Anas platyrhynchos*) e em Galinha d'angola (*Numida meleagris*) criadas no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Alíquotas de soro foram encaminhadas para o Setor de Clostridioses do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) para pesquisa da toxina botulínica por SN em camundongos, resultando na detecção da toxina botulínica tipo C. Este foi primeiro relato de botulismo em aves domésticas na região Nordeste do Brasil, e a primeira descrição da doença em galinha d'angola.

Devido ao fato dos esporos de *C. botulinum* serem resilientes e estarem frequentemente presentes nas áreas úmidas, tentativas para reduzir ou eliminar o agente não são atualmente viáveis, apenas algumas ações para mitigar a ocorrência do botulismo, reduzindo os fatores ambientais predisponentes são praticáveis, como: evitar o acúmulo de matéria orgânica em zonas úmidas, especialmente nas áreas de repouso e alimentação de aves aquáticas migratórias (patos, gansos, cisnes entre outras). A morte do gado bovino por botulismo e a permanência das carcaças no pasto é uma importante fonte de contaminação dos ambientes úmidos, por essa razão é recomendado a vacinação anual de todo o rebanho, antes do período das chuvas. Na primeira imunização recomenda-se um reforço da vacina, quatro a seis semanas após a primeira dose (DUTRA et al., 2001). Outra estratégia de controle é a destinação adequada de todas as carcaças de animais, enterrando-as ou queimando-as, especialmente durante os surtos de botulismo, reduzindo a disponibilidade de substrato para a proliferação do *C. botulinum* e produção de toxina. A importância da remoção rápida e completa das carcaças e eliminação adequada não podem ser subestimadas. Vários milhares de larvas de insetos contaminadas pela toxina botulínica podem ser produzidas a partir de uma única carcaça. O consumo entre duas a quatro dessas larvas pode ser letal para um pato, perpetuando o ciclo de botulismo na área (YULE et al., 2006).

Com base no exposto sobre a febre do Nilo Ocidental e o botulismo é possível observar que as pesquisas, muitas vezes, têm uma motivação econômica ou de saúde pública quanto investiga os surtos em animais ou humanos. No Brasil, com algumas exceções, essa tendência se repete, com reduzidos esforços/recursos para a inclusão de fatores ambientais relevantes e à

investigação de potenciais reservatórios silvestres de vida livre na epidemiologia dessas zoonoses.

Talvez por essa razão, casos de infecção por VNO e intoxicação por toxina botulínica em aves silvestres de vida livre não tenham sido corretamente diagnosticados, apesar de poderem contribuir para a endemicidade e dispersão dessas zoonoses e representarem um fator de risco, ainda pouco avaliado, para a conservação da biodiversidade.

2 HIPÓTESE DO TRABALHO

2.1 O vírus do Nilo Ocidental (VNO) está presente em populações de aves silvestres de vida livre no Brasil e pode estar associado à presença de aves migratórias infectadas;

2.2 O botulismo em aves silvestres de vida livre de ambientes aquáticos ocorre no Brasil e pode causar surtos com elevada mortalidade.

3 OBJETIVOS DO TRABALHO

3.1 Objetivo Geral

Investigar a possível ocorrência de casos de infecção por VNO e casos de botulismo em aves silvestres de vida livre na região Nordeste do Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 - Realizar o inventário das aves migratórias nas principais rotas de migração existentes na região Nordeste do Brasil;

3.2.2 - Realizar inventário das aves nos principais pontos onde houve relato de elevada mortalidade destes animais;

3.2.3 - Coletar amostras de sangue, suabs de cloaca, cérebro e vísceras das aves nas áreas identificadas anteriormente para fins diagnósticos virológico no Instituto Evandro Chagas/PA;

3.2.4 - Coletar amostras de água e substratos nos locais identificados, para análise de metais pesados e microbiológicos, a serem realizadas no laboratório da CETREL (Empresa de Proteção Ambiental do Polo Petroquímico de Camaçari/BA);

3.2.5 - Coletar amostras de água, substratos e material biológico de aves debilitadas e mortas para análise de toxina botulínica no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araçatuba/SP.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. A. A.; LIMA, P. C.; ANDRADE, M. A.; JAYME, V. D. S.; RAMOS, D. G.; SILVEIRA, S. L. DA. Soroprevalência de anticorpos “anti-arbovírus” de importância em saúde pública em aves selvagens, Brasil - 2007 e 2008. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 115–123, 2012.

ARAÚJO, F. A. A.; VIANNA, R. S. T.; ANDRADE FILHO, G. V.; MELHADO, D. L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G. C.; FEDRIZZI, C. E.; MAGALHÃES, V. S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M. A. B.; PORTELLA, A. S.; SANTOS, E.; SCHERER, S. B. Segundo Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe para Detecção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental, Influenza Aviária, Newcastle e outros Vírus. **Boletim Eletrônico da Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde - MS**, v. 2, n. 2, 2005.

ARAÚJO, F.; VIANNA, R.; WADA, M.; SILVA, E.; DORETTO, L.; CAVALCANTE, G. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico - Ministério da Saúde - MS**, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2004.

ARTSOB, H.; GUBLER, D. J.; ENRIA, D. A.; MORALES, M. A.; PUPO, M.; BUNNING, M. L.; DUDLEY, J. P. West Nile virus in the new world: Trends in the spread and proliferation of West Nile virus in the western Hemisphere. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 357–369, 2009.

BARR, A. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. **Am J Trop Med Hyg**, v. 6, p. 153–165, 1957.

BEATTY, M. E.; HUNSPERGER, E.; LONG, E. Mosquito-borne infections after Hurricane Jeanne, Haiti. **Emerging Infectious Disease Journal - CDC**, v. 13, 2007.

BERNARD, W.; DIVERS, T. J.; WHITLOCK, R. H.; MESSICK, J.; TULLENERS, E. Botulismo como um sequela para abrir a castração em um cavalo. **Journal of a American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 73–74, 1987.

BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J.-C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A. E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L. West Nile virus, Venezuela. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 651–653, 2007.

BOTT, T. L.; DEFFNER, J. S.; MCCOY, E.; FOSTER, E. M. *Clostridium botulinum* type E in fish from the Great Lakes. **J. Bacteriol**, v. 91, p. 919–924., 1966.

BRASIL. **Ministério da Saúde - ms. normas e manuais técnicos / guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde - MS: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

CANN, D. C.; TAYLOR, L. Y. An outbreak of botulism in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, farmed in Britain. **Journal of Fish Diseases**, v. 5, p. 393–399, 1982.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis-New York, 1999. **MMWR Morb Mortal Wkly**, v. 48, p. 845–849, 1999.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Epizootic West Nile Virus in the United States: Revised Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. In: Infectious Diseases - Workshop Held, Charlotte, North Carolina. **Anais...** Charlotte, North Carolina: Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Center for Infectious Diseases Division of Vector-Borne, 2001.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. West Nile Virus transmission through blood transfusion – South Dakota, 2006. **J. Am. Med. Assoc**, v. 297, p. 1186–1188, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. West Nile Virus Disease and other arboviral diseases – United States, 2011. v. 61, p. 510–514, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm>. Accessed 12/7/2012.>.

CHARLES H., C.; NICK, K.; JOEL M., D.; ROBERT E., S.; JAMES S., P.; EDWIN G., W.; WALTER E., B. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. **J. gen. Virol**, v. 70, p. 37–43, 1989.

COLLINS, M. D.; EAST, A. K. Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. **J. Appl. Microbiol**, v. 84, p. 5–17, 1998.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE / MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, M. Resolução CONAMA Nº 477/2016. In: Publicação DOU, de 04/11/2016, Seção 1, Brasília, Brasil. **Anais...** Brasília, Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2016.

CRUZ, L.; CARDENAS, V. M.; ABARCA, M.; RODRIGUEZ, T.; REYNA, R. F.; SERPAS, M. V.; FONTAINE, R. E.; BEASLEY, D. W. C.; DA ROSA, A. P. a T.; WEAVER, S. C.; TESH, R. B.; POWERS, A. M.; SUAREZ-RANGEL, G. Short report: serological evidence of West Nile virus activity in El Salvador. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 5, p. 612–615, 2005.

DAY, J. F.; TABACHNICK, W. J. Introduction of the West Nile Virus to North America. **Medical Entomology On-line**, 1999.

DEFILIPPO, F.; LUPPI, A.; MAIOLI, G.; MARZI, D.; FONTANA, M. C.; PAOLI, F.; BONILAUDI, P.; DOTTORI, M.; MERIALDI, G. Outbreak of Type C Botulism in Birds and Mammals in the Emilia Romagna Region, Northern Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 4, p. 1042–1046, 2013.

DEGALLIER, N.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; SILVA, J. M. C. da; GUERREIRO-RODRIGUES, S.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J. F. S.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; PEREIRA-DA-SILVA, R. As aves como hospedeiras de arbovírus na

Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, série Zoologia**, v. 8, n. 2, p. 69–111, 1992.

DHAKED, R. K.; SINGH, M. K.; SINGH, P.; GUPTA, P. Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug. **Indian J Med Res**, v. 132, n. 5, 2010.

DIAZ, L. A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; JURI, M. J. D.; STEIN, M.; ALLENDE, R. L.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W.; CONTIGIANI, M. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689–691, 2008.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; LANGENEGGER, J.; DUTRA, I. S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Tierärztliche Wochenschrift , Stuttgart, Alemanha**, v. 99, n. 5, 1992.

DOHMS, J. E.; CLOUD, S. S. Susceptibility of broiler chickens to Clostridium botulinum type C toxin. **Avian Dis**, v. 26, p. 89–96, 1982.

DUNCAN, R. M.; JENSEN, D. W. I. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. 1976.

DUPUIS, a P.; MARRA, P. P.; REITSMA, R.; JONES, M. J.; LOUIE, K. L.; KRAMER, L. D. Short report: Serologic evidence for West Nile virus transmission in Puerto Rico and Cuba. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 474–476, 2005.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a doença da vaca caída: botulismo. **A Hora Veterinária, Porto Alegre**, v. 84, p. 07–10, 1995.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, L. A. A.; NONATO, M. os de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro**, v. 21, n. 2, p. 43–48, 2001.

ESTRADA-FRANCO, J. G.; NAVARRO-LOPEZ, R.; BEASLEY, D. W. C.; COFFEY, L.; CARRARA, A. S.; DA ROSA, A. T.; CLEMENTS, T.; WANG, E.; LUDWIG, G. V.; CAMPOMANES CORTES, A.; PAZ RAMIREZ, P.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T.; WEAVER, S. C. West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1604–1607, 2003.

FIGUEIREDO, M. L. G. de; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004–2014. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 13, p. 955–961, 2014.

FORRESTER, J. D.; WENNER, F. H.; WHITE, E. C.; GREINER, W. R.; MARION, J. E. T.; BERKHOFF, G. A. Uma epizootia de botulismo aviária em uma mina de fosfato resolver lagoa no norte Florida. **Jornal de Doenças Vida Selvagem**, v. 16, p. 323–327, 1980.

GLAZER, A. West Nile virus and North America: an unfolding story. **Rev Sci Tech**, p. 557–568, 2004.

GODSEY, M. S.; BURKHALTER, K.; YOUNG, G.; DELOREY, M.; SMITH, K.; TOWNSEND, J.; LEVY, C.; MUTEBI, J. P. Entomologic investigations during an outbreak of West Nile virus disease in Maricopa County, Arizona, 2010. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1125–1131, 2012.

GUBLER, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 8, p. 1039–1046, 2007.

HANNETT, G. E.; STONE, W. B.; DAVIS, S. W.; WROBLEWSK, D. Biodiversity of Clostridium botulinum Type E Associated with a Large Outbreak of Botulism in Wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. **PubMed**, v. 77, n. 3, p. 1061–8, 2011.

HAUSCHILD, A. H. W.; DODDS, K. L. **Clostridium botulinum ecology and control in foods**. New York: Marcel Dekker Inc, 1993.

HAYES, C. G.; MONATH, T. P. The arboviruses: epidemiology and ecology. **CRC Press**, p. 55–88, 1989.

HAYES, E.; KOMAR, N.; NASCI, R.; MONTGOMERY, S.; O'LEARY, D.; CAMPBELL, G. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerg Infect Dis.**, v. 8, n. 11, p. 1167–73, 2005.

HEDELAND, M.; MOURA, H.; BÅVERUD, V.; WOOLFITT, A. R.; BONDESSON, U.; BARR, J. R. Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1299–1305, 2011.

HUANG, S.; MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G. Reexamination of Culex pipiens hybridization zone in the eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 434–441, 2011.

HUBALEK, Z.; HALOUZKA, J. Persistence of Clostridium botulinum type C in blow fly (Calliphoridae) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. **Wildl. Dis.**, v. 27, p. 81–85, 1991.

HUBALEK, Z.; HALOUZKA, J.; JURICOVA, Z. West Nile fever in Czechland. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, n. 5, p. 594–595, 1999.

HUBALEK, Z.; LUKÁČOVÁ, L.; HALOUZKA, J. Import of West Nile Virus Infection in the Czech Republic. **Eur J Epidemiol**, v. 21, n. 3, p. 323, 2006.

HUSS, H. H.; ESKILDSEN, U. Botulism in farmed trout caused by Clostridium botulinum type E. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 26, p. 733–738, 1974.

JOHNSON, E. A.; MONTECUCCO, C. **Botulism. in handbook of clinical neurology**. New York: Elsevier, 2008.

KAUFMANN, O. W.; FAY, L. D. Clostridium botulinum type E toxin in tissues of dead loons and gulls. **Mich. State Univ. Agric. Exp. Sta. Quart. Bull.**, v. 47, p. 236–42, 1964.

KILPATRICK, A. M.; KRAMER, L. D.; JONES, M. J.; MARRA, P. P.; DASZAK, P. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. **PLoS Biology**, v. 4, n. 4, p. 606–610, 2006a.

KILPATRICK, a M.; CHMURA, A. a; GIBBONS, D. W.; FLEISCHER, R. C.; MARRA, P. P.; DASZAK, P. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19368–19373, 2006b.

KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S.; NEMETH, N.; EDWARDS, E.; HETTLER, D.; DAVIS, B.; BOWEN, R. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, p. 311–322, 2003.

KOOPMANS, M.; MARTINA, B.; REUSKEN, C.; VAN, M. K. **Emerging pests and vector-borne diseases in europe**. 1. ed. The Netherlands: Wageningen AcademicPublisher, 2007. v. 14

KOTHERA, L.; NELMS, B. M.; REISEN, W. K.; SAVAGE, H. M. Population genetic and admixture analyses of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations in California, United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1154–1167, 2013.

KRICK, N.; JAW, C.; THOMSON, G.; TUSTIN, R. **Infectious diseases of livestock with special reference to southern africa**. Cape Town: Oxford Univ Pr, 1994. v. 2

LALITHA, K. V.; SURENDRAN, P. K. Occurrence of *Clostridium botulinum* in fresh and cured fish in retail trade in Cochin (India). **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, 2002.

LANCIOTTI, R.; EBEL, G.; DEUBEL, V.; KERST, A.; MURRI, S. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 1, n. 298, p. 96–105, 2002.

LINDSTROM, M.; KORKEALA, H. Laboratory diagnostics of botulism. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 298–314, 2006.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P. West Nile Encephalitis, our next epidemic? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 1, p. 7–19, 2003.

LYLE, R. P.; BRAULT, A. C.; NASC, R. S. West Nile Virus: Review of the Literature. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 3, p. 308–315, 2013.

MANN, B. R.; MCMULLEN, A. R.; SWETNAM, D. M.; BARRETT, A. D. T. Molecular epidemiology and evolution of West Nile virus in North America. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 5111–5129, 2013.

MATTAR, S.; EDWARDS, E.; LAGUADO, J.; GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ, J.; KOMAR, N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 9, p. 1497–1498, 2005.

MCLEAN, R. G. West Nile Virus in North American Birds. **USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications.**, n. 60, p. 44–64, 2006.

MCLOUGHLIN, M.; MCILROY, S.; NEILL, S. A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. **Vet Rec**, v. 122, p. 579–581, 1988.

MONHEIMER, R. H. The relationship of Lake Michigan waterbird mortalities to naturally occurring *Clostridium botulinum* type E toxin. **Bull. Wildl**, 1968.

MORALES, M. A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J. B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; GUTIERREZ, G.; PIGRETTI, S.; MENCHACA, H.; GARRIDO, N.; TAYLOR, N.; FERNANDEZ, F.; LEVIS, S.; ENRÍA, D. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1559–1561, 2006.

NASH, D.; FARZAD, M.; FINE, A.; JAMES, M.; O’LEARY, D.; MURRAY, K.; HUANG, A.; ROSENBERG, A.; GREENBERG, A.; SHERMAN, M.; WONG, S.; LAYTON, M. The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 24, p. 1807–1814, 2001.

OLINDA, R. G.; GOIS, R. C. S.; SILVA, R. O. S.; CALDAS, R. P.; LOBATO, F. C. F.; BATISTA, J. S. Surto de botulismo tipo C em aves domésticas no semiárido do Nordeste, Brasil. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 22, n. 3–4, p. 157–159, 2015.

OMETTO, T.; DURIGON, E. L.; DE ARAUJO, J.; APRELON, R.; DE AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; MELO, R. M.; LEVI, J. E.; JUNIOR, S. M. d. A.; PETRY, M. V.; NETO, I. S.; SERAFINI, P.; VILLALOBOS, E.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. d. C. C. S. H.; NAVA, A. F. D.; NARDI, M. S.; HURTADO, R.; RODRIGUES, R.; SHERER, A. L.; SHERER, J. d. F. M.; GERALDI, M. P.; DE SEIXAS, M. M. M.; PETERKA, C.; BANDEIRA, D. d. S.; PRADEL, J.; VACHIERY, N.; LABRUNA, M. B.; DE CAMARGO, L. M. A.; LANCIOTTI, R.; LEFRANCOIS, T. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013.

OWEN, J.; MOORE, F.; PANELLA, N.; EDWARDS, E.; BRU, R.; HUGHES, M.; KOMAR, N. Migrating Birds as Dispersal Vehicles for West Nile Virus. **EcoHealth**, v. 3, n. 2, p. 79–85, 2006.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M. A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M. F.; DA SILVA, E. E.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.

PLATONOV, A. E.; KARAN’, L. S.; SHOPENSKAIA, T. A.; FEDOROVA, M. V.; KOLIASNIKOVA, N. M.; RUSAKOVA, N. M.; SHISHKINA, L. V.; ARSHBA, T. E.; ZHURAVLEV, V. I.; GOVORUKHINA, M. V.; VALENTSEVA, A. A.; SHIPULIN, G. A. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 2, p. 29–37, 2011.

PROMED-MAIL. **West Nile virus, human – Uruguay ex USA.** [s.l: s.n.].

PUPO, M.; GUZMÁN, M. G.; FERNÁNDEZ, R.; LLOP, A. West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 4–6, 2006.

RAPPOLE, J. H.; HUBALEK, Z. Migratory birds and West Nile virus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 47S–58S, 2003.

REISEN, W.; BARKER, C.; CARNEY, R.; LOTHROP, H.; WHEELER, S.; WILSON, J. Papel dos corvídeos na epidemiologia do vírus do Nilo Ocidental no sul da Califórnia. **J Med Entomol.**, v. 43, p. 356–367, 2006.

RIBAS, A. I.; FERREIRA, R. M. .; MASSER, R. .; CIANI, R. B.; DUTRA, I. . Detecção de esporos de *Clostridium botulinum* em costelas de cadáveres decompostos de bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Olinda. **Anais...** Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994.

ROCKE, T. E.; FRIEND, M. *Field Manual of Wildlife Diseases*. v. 38, 1999.

ROCKE, T. E.; SAMUEL, M. D. Water and sediment characteristics associated with avian botulism outbreaks. 1999.

SAVAGE, H. M.; AGGARWAL, D.; APPERSON, C. S.; KATHOLI, C. R.; UNNASCH, E.; UNNASCH, T. R. Host Choice and West Nile Virus Infection Rates in Blood-Fed Mosquitoes, Including Members of the *Culex pipiens* Complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002–2003. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 3, p. 365–386, 2007.

SAVAGE, H. M.; KOTHERA, L. The *Culex Pipiens* Complex in the Mississippi River Basin: Identification, Distribution, and Bloodmeal Hosts. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 4, p. 93–99, 2012.

SBMT - SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. Caso de febre do Nilo Ocidental no Piauí é preocupante, alertam especialistas. **Newsletter SBMT**, v. 41, 2014. Disponível em: <<http://sbmt.org.br/portal/caso-de-febre-do-nilo-ocidental-no-piaui-e-preocupante-alertam-especialistas>>.

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**, v. 80, p. 717–766, 2000.

SHAYEGANI, M.; STONE, W.; HANNETT, G. An outbreak of botulism in waterfowl and fly larvae in New York State. **J Wildl Dis**, n. 20, p. 86–89., 1984.

SMITH, G. R. Botulism in waterfowl. **Wildfowl**, v. 27, p. 126, 1976.

SMITH, L. D. S. The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. **Health Lab Science**, v. 15, p. 74–80, 1978.

SMITHBURN, K. C.; HUGHES, T. P.; BURKE, A. W.; PAUL, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 20, p. 472–472, 1940.

STEINMAN, A.; BANET-NOACH, C.; TAL, S.; LEVI, O.; SIMANOV, L.; PERK, S.; MALKINSON, M.; SHPIGEL, N. West Nile virus infection in crocodiles. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 7, p. 887–889, 2003.

SWADDLE, J. P.; CALOS, S. E. Increased Avian Diversity Is Associated with Lower Incidence of Human West Nile Infection: Observation of the Dilution Effect. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. e2488, 2008.

TAYLOR, R.; WORK, T.; HURLBUT, H.; RIZK, F. A. Study of the ecology of west nile virus in Egypt. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 5, p. 579–620, 1956.

TBER, A. West Nile fever in horses in Morocco. **Bull Off Int Epizoot**, p. 867–869, 1996.

TORRES APONTE, J.; E. GARCÍA RIVERA, S.; STRAMER, R.; CASANOVA, G.; FOSTER, R.; LUCE, K.; TOMASHEK, H.; MOHAMMED, W. E.; HUNSPERGER, J. L.; MUNˆOZ-JORDA N, C.; COLON, E. Detection of West Nile virus in blood donations--Puerto Rico, 2007. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 57, n. 21, p. 577–580, 2008.

TSAI, T.; POPOVICI, F.; CERNESCU, C.; CAMPBELL, G.; NEDELUCU, N. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. **The Lancet**, v. 352, n. 9130, p. 767–771, set. 1998.

ULLOA, A.; LANGEVIN, S. A.; MENDEZ-SANCHEZ, J. D.; ARREDONDO-JIMENEZ, J. I.; RAETZ, J. L.; POWERS, A. M.; VILLARREAL-TREVIÑO, C.; GUBLER, D. J.; KOMAR, N. Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest region of Chiapas, Mexico. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 3, n. 1, p. 3–9, jan. 2003.

VASCONCELOS, P.F.C TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R. E.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. **An overview of arbovirology in brazil and neighbouring countries - arboviruses pathogenic for man in brazil.** Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998.

VIDAL, D.; ANZA, I.; TAGGART, M. A.; PÉREZ-RAMÍREZ, E.; CRESPO, E.; HOFLE, U.; MATEO, R. Environmental Factors Influencing the Prevalence of a Clostridium botulinum Type C/D Mosaic Strain in Nonpermanent Mediterranean Wetlands. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 14, p. 4264–4271, 2013.

VIEIRA, M. C. e S.; AGUIAR, A. de A. X.; BORBA, A. de S.; LIMA, H. C. west Nile fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 57, n. 3, p. 276, 2015.

WŁODARCZYK, R.; MINIAS, A. P.; KUKIER, E.; GREŃDA, T.; ŚMIETANKA, K.; JANISZEWSKI, T. The First Case of a Major Avian Type C Botulism Outbreak in Poland. **American Association of Avian Pathologists**, v. 58, n. 3, p. 488–490, 2014.

WOBESER, G. Avian botulism - another perspective. **Wild. Dis**, v. 33, p. 181–186, 1997.

YULE, A.; AUSTIN, J. W.; BARKER, I. K.; MOCCIA, B. Persistence of Clostridium botulinum neurotoxin type E in tissues from selected fresh water fish species: Implications to public health. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1164–1167, 2006.

ZEINAD, A. K.; NOVARETTI, M. C. Z.; CHAMONE, D. A. F. Vírus do Nilo Ocidental – Nova ameaça à segurança transfusional ? West Nile virus – A new threat to transfusion safety ? **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 26, n. 2, p. 114–121, 2004.

ZELLER, H. G.; SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 147–156, 2004.

5 ARTIGO CIENTÍFICO I

Evidência sorológica de infecção prévia por arbovirus em aves silvestres da área de registro do primeiro caso humano de encefalite pelo vírus do Oeste do Nilo no Brasil

RESUMO

No decorrer da epidemia da febre do Nilo Ocidental ocorrida na Europa, 1996 a 2001, o vírus chegou aos EUA em 1999, se dispersando para o norte, bem como, para a América Central e do Sul. No Brasil, o primeiro artigo sobre a presença de anticorpos contra o vírus do Nilo Ocidental (VNO) data de 2009, em cavalos na região do Pantanal. No entanto, em 2013, outro artigo relata a presença de anticorpos anti- VNO em equinos do estado de Rondônia, região Norte do país, em amostras coletadas em 2002. Em agosto de 2014, um trabalhador rural do município de Aroeiras do Itaim, estado do Piauí, apresentou um quadro de encefalite causado pelo vírus do Nilo Ocidental, sendo o primeiro caso humano registrado no Brasil. O presente trabalho objetivou investigar a epidemiologia desse foco, abordando a possível participação de espécies de aves silvestres residentes e migratórias no ciclo de transmissão de VNO. A pesquisa viral e sorológica nas amostras coletadas nessas aves, incluíram, além do VNO, outros arbovírus de importância epidemiológica no Brasil. Foram capturadas 242 aves de 38 espécies, com taxa de coleta de material para a sorologia pelo teste de inibição por hemaglutinação (IH) de 13,63% (33/242), das quais foram reagentes 18,18% (6/33), sendo que cinco delas para VNO. As seis amostra que apresentaram reação foram analisadas com a técnica de neutralização por redução de placas (PRNT), com resultados positivos para VNO em três amostras de espécies residentes: *Columbina talpacoti*, *Piaya cayana* e *Turdus rufiventris*, destacando a importância da participação de espécies silvestres de aves residentes no ciclos de transmissão do VNO no Brasil, tendo em vista que esses resultados foram obtidos na mesma área onde ocorreu o primeiro caso humano de FNO. O presente estudo representa o primeiro registro de infecção por VNO em aves silvestres residentes no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Flavivírus, febre do Nilo Ocidental, Vírus do Oeste do Nilo, aves silvestres.

ABSTRACT

In the course of the epidemic of West Nile fever in Europe, 1996-2001, the virus arrived in the United States in 1999, spreading to the north as well as to Central and South America. In Brazil, the first article on Presence of antibodies against West Nile virus (WNV) dates back to 2009, in horses in the Pantanal region. However, in 2013, another article reports the presence of anti-WNV antibodies in horses from the state of Rondônia, northern region of the country, in samples collected in 2002. In August 2014, a rural worker in the municipality of Aroeiras do Itaim, state Of Piauí, presented a picture of encephalitis caused by West Nile virus, being the first human case registered in Brazil. The present work aimed to investigate the epidemiology of this focus, addressing the possible participation of wild and migratory wild bird species in the WNV transmission cycle. Viral and serological research on the samples collected in these birds included, in addition to WNV, other arboviruses of epidemiological importance in Brazil. A total of 242 birds from 38 species were collected, with a collection rate of 13.63% (33/242) hemagglutination inhibition (HI), of which 18.18% (6/33) , Five of them for WNV. The six samples that showed a reaction were analyzed using the plate reduction neutralization technique (PRNT), with positive results for WNV in three samples of resident species: *Columbina talpacoti*, *Piaya cayana* and *Turdus rufiventris*, highlighting the importance of the participation of wild species Of birds resident in the WNV transmission cycles in Brazil, considering that these results were obtained in the same area where the first human case of WNV occurred. The present study represents the first WNV record in wild birds resident in Brazil.

KEY WORDS: Flavivirus, West Nile fever, West Nile virus, wild birds, Brazil.

5.1 INTRODUÇÃO

O vírus do Oeste do Nilo Ocidental (VNO) é um *flavivírus*, agente etiológico da febre do Nilo Ocidental (FNO), uma zoonose emergente em diversos países. O VNO foi isolado pela primeira vez em 1937, a partir do sangue de uma paciente, em uma província do oeste de Uganda, na África Central (SMITHBURN. et al., 1940).

O VNO foi negligenciado quanto a sua importância para a saúde pública, pois a maioria das infecções é assintomática ou oligossintomática, caracterizada por febre aguda inespecífica de baixa gravidade (HAYES e MONATH, 1989). No entanto, um subtipo do vírus com maior virulência e potencial epidêmico emergiu no início de 1990 (GUBLER, 2007). Desde então, casos graves ou letais de infecção pelo VNO passaram a ser documentados em diversos táxons de vertebrados, incluindo aves, répteis, anfíbios e diversas espécies de mamíferos, inclusive humanos, sendo que algumas aves silvestres se destacam como reservatórios e replicadores do VNO (CDC, 2013).

Em meados da década de 1990, uma importante epidemia da Febre do Nilo Ocidental (FNO) ocorreu na Europa, com elevada taxa de infecção neurológica nas áreas mais baixas do vale do Danúbio e Bucareste, Romênia (TSAI et al., 1998). Os surtos, envolvendo humanos e animais com distúrbios neurológicos, alertaram para a importância do VNO para a saúde humana e animal (TBER, 1996; PLATONOV et al., 2011). Após as ocorrências registradas na Europa, surtos esporádicos foram registrados na África, Ásia e Oriente Médio, sendo que, em 1999, foram notificados os primeiros casos nos EUA (ZELLER & SCHUFFENECKER, 2004). Desde então, vários registros do VNO ocorreram nas Américas, associados à sintomatologia neuroinvasiva em humanos e equinos, em parte, acompanhados por elevada mortalidade de aves silvestres, como ocorreu no Nordeste dos EUA (CDC, 2013) (Apêndice 1). A partir de 2001, detecções do VNO ou anticorpos anti- VNO passaram a ser relatadas no Canadá, México, América Central, e Caribe (ULLOA et al., 2003; CRUZ et al., 2005; PUPO et al., 2006; CDC, 2013).

Na América do Sul, o VNO foi detectado pela primeira vez em equinos na Colômbia (STEINMAN et al., 2003), seguido da Venezuela em 2004 (BOSCH et al., 2007). Na Argentina, em 2005, o vírus foi isolado em equídeos com sinais neurológicos. Anticorpos anti- VNO foram detectados, tanto em equinos como em aves silvestres (DIAZ et al., 2008).

No Brasil, no ano de 2002, equinos do estado de Rondônia, região Norte do país, apresentaram anticorpos anti- VNO. Esse foi o primeiro registro da infecção por VNO em animais no país, o qual foi seguido por novos registros em equinos e em aves migratórias nos estados do Pará, Maranhão e Rio Grande do Sul, localizados nas regiões Norte, Nordeste e Sul do Brasil respectivamente (OMETTO et al., 2013). Em 2009, equinos de seis fazendas situadas no Pantanal, região Centro-Oeste, apresentaram anticorpos anti-VNO. Posteriormente ocorreram novos registros em equinos na mesma região, destacando o potencial de dispersão do VNO no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011 & 2014). Também no Pantanal, em 2010, aves domésticas (*G. gallus*) foram detectadas com anticorpos anti-VNO (MELANDRI et al., 2012). Posteriormente, foi feita a detecção sorológica de infecção por VNO em um equino, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, o que chamou a atenção para a possível dispersão do VNO no país (SILVA et al., 2013).

Em 2014, um trabalhador rural do município de Aroeiras do Itaim, estado Piauí, também na região (Apêndice 2) Nordeste, foi admitido no Instituto Natan Portella, para Doenças Tropicais de Teresina, capital do estado, com sintomas clínicos de encefalite aguda. O diagnóstico resultou positivo para infecção pelo VNO, confirmando o primeiro caso humano no Brasil (VIEIRA et al., 2015).

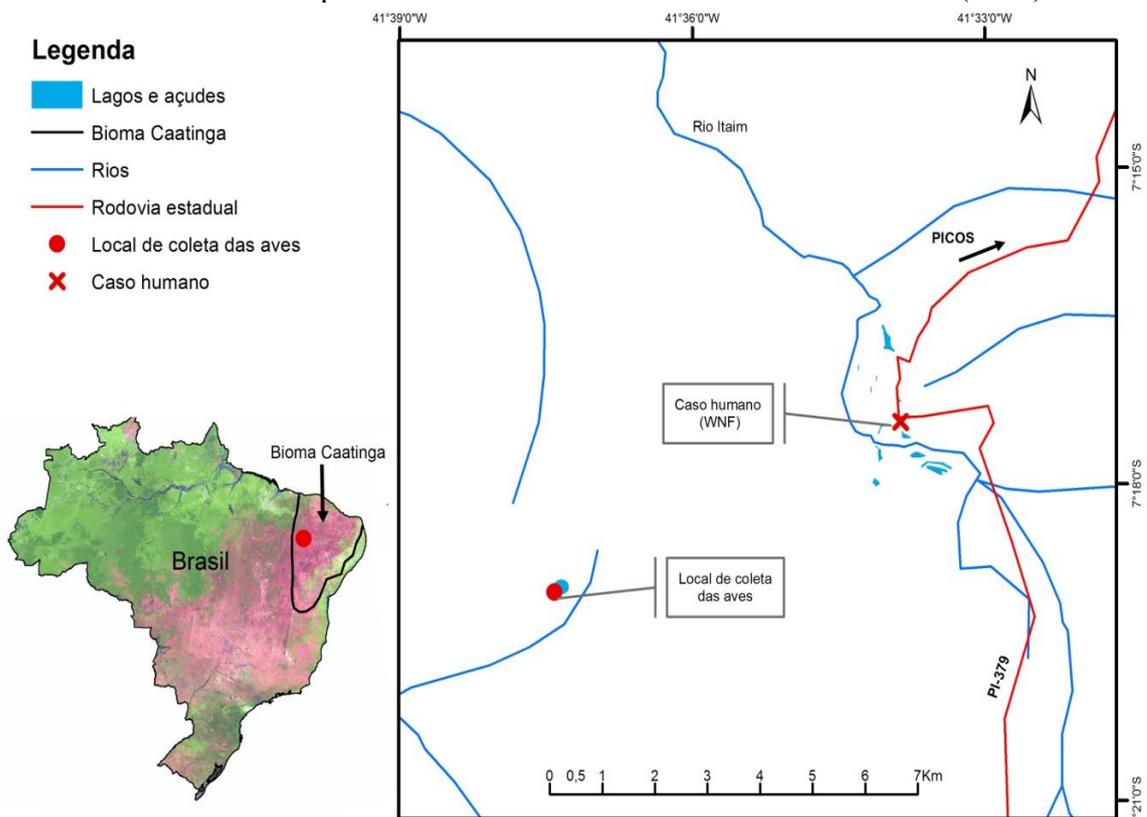
O envolvimento de aves silvestres na epidemiologia da febre do Nilo Ocidental, é bem documentada na América do Norte e Caribe, em virtude da elevada mortalidade causada em espécies susceptíveis (GUBLER, 2007). Na América do Sul, ainda são poucos os relatos de infecção pelo VNO em aves silvestres, sendo que no Brasil são raros os estudos de infecção nessas espécies. O presente estudo pesquisou a presença do VNO e anticorpos anti-VNO, além de outras espécies de arbovírus, em amostras de aves silvestres residentes e migratórias na área onde Vieira et al. (2015) registraram o primeiro caso humano de encefalite pelo VNO no Brasil.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa da ocorrência de VNO em espécies de aves silvestres (residentes e migratórias) foi realizada no município de Aroeiras do Itaim, estado do Piauí ($07^{\circ}17'21''W41^{\circ}33'50''S$), situado na região semiárida, bioma Caatinga no Nordeste do Brasil, no período de 4 a 11 de dezembro de 2014.

O local de captura das aves foi selecionado por apresentar fragmentos de mata preservada, trechos de capoeira e vários açudes, frequentados por diversos bandos de aves. Esta área se localiza a sete quilômetros do local onde foi registrado do primeiro caso humano de FNO no Brasil, ocorrido seis meses antes do início do presente estudo (Figura 15).

Figura 15. Caracterização geográfica do município de Aroeiras do Itaim, área de captura das aves e local de residência do primeiro caso humano de Febre do Nilo Ocidental (FNO) no Brasil.



Fonte: Ricardo Lustosa/Pedro Cerqueira Lima

Para captura das aves, foram utilizadas 40 redes de neblina, tamanho 12x2m, apropriadas para captura, das quais 30 foram armadas no interior da mata, e 10 foram dispostas em um pequeno açude frequentado pelo gado, por aves de ambiente aquático e bandos de aves

de campos abertos, especialmente as da família *Columbidae*. O local de captura das aves dista 7 km da residência do primeiro caso humano de encefalite pelo VNO no Brasil (VIEIRA et al., 2015) (Figura 16) A captura das aves foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio/CEMAVE - Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres - SNA (Projeto/Autorização: 3891/1- Registro: 324582), (Anexo 1).

As capturas foram realizadas em três dias no período diurno (das 05h e 30min e às 17h 00), sendo que em dois desses dias, as redes foram armadas também às 03h, objetivando a captura de aves de hábito noturno. As redes foram vistoriadas a cada 30min para a retirada das aves presas, as quais foram acondicionadas em sacos de tecido e levadas para o laboratório de campo, para identificação, coleta de dados morfométricos, que foram registrados em planilhas de campo (Apêndice 4) e determinação do status de migratória ou residente, segundo Grantsau (2010), e para anilhamento e coleta de sangue.

Passado o estresse decorrente da manipulação, as aves foram soltas nos locais das capturas. O sangue foi coletado por punção venosa (jugular direita ou veia ulnar), utilizando agulha intradérmica, com seringa de insulina de 1 ml, respeitando-se o limite máximo de 1,0% do peso vivo da ave. As amostras, quando em quantidades suficientes, foram centrifugadas para obtenção do soro e quando em quantidades reduzidas, o sangue total foi acondicionado (Apêndice 5). Todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido para o diagnóstico sorológico ou isolamento viral. As análises foram realizadas no laboratório de referência nacional do Ministério da Saúde, Instituto Evandro Chagas, Belém, estado do Pará (IEC/PA), região Norte do Brasil.

Para o diagnóstico sorológico foi empregado o teste de Inibição de Hemaglutinação (IH) segundo CLARKE & CASALS (1958), modificado para microplacas por SHOPE (1963). Foram testados os seguintes arbovírus: Vírus do Nilo Ocidental (VNO), Encefalite Equina do Leste (EEEV), Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Mucambo (MUCV - vírus da Encefalite Equina Venezuelana - VEEV, subtipo IIIA), Mayaro (MAYV), Encefalite Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV), Cacipacoré (CPCV), Bussuquara (BSQV), Vírus da Febre Amarela (VFA), Oropouche (OROV), Maguari (MAGV), Tacaiuma (TCMV), Icoaraci (ICOV), Utinga (UTIV), Belém (BLMV), Caraparu (CARV) e Catu (CATUV).

Os anticorpos foram titulados a partir de 1:20 (*cut-off*) até 1:1.280. As amostras reagentes, com títulos de anticorpos ≥ 20 , para apenas uma espécie de vírus dentro de cada

grupo foram classificadas como reações monotípicas, e as reações cruzadas (RC) corresponderam às amostras com títulos de anticorpos ≥ 20 para mais de um vírus de um mesmo gênero.

Visando esclarecer e confirmar a detecção de anticorpos pelo teste de IH, foi realizada a técnica de neutralização por redução de placas (PRNT), segundo Early et al. (1967) e Tauro et al. (2012). Foram utilizadas placas de 24 poços contendo células VERO (células de rim de macaco-verde-africano, *Cercopithecus aethiops*) a uma concentração de $1,6 \times 10^5$ células, onde as amostras de soro das aves foram testadas em diluições em série (1:20 a 1: 640) em duplicata, contra uma média de 100 unidades formadoras de placas (PFU) do Vírus da encefalite Saint Louis (ChimeraVax-SLEV), Vírus do Nilo Ocidental (ChimeraVax- VNO) e Vírus Ilheus. O título dos anticorpos neutralizantes foi definido como o recíproco da diluição do soro que reduziu o número de placas em 90,0 %. As amostras contendo anticorpos neutralizantes contra ambos os vírus foram consideradas positivas para um deles quando o título de anticorpo foi quatro vezes maior do que o obtido para o outro vírus; Caso contrário, a amostra teria apresentado reação cruzada (RC) para o vírus em questão. As quimeras foram gentilmente doadas pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) ao Instituto Evandro Chagas SVS/MS.

Para tentativa de isolamento viral foram utilizados cultivos celulares (células C6/36-clone *Aedes albopictus* e VERO - rim de macaco-verde-africano), as quais foram inoculadas com os espécimes biológicos, e observadas diariamente para visualização de efeito citopatogênico. A confirmação da presença do vírus em células infectadas foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), descrita por Gubler et al. (1984), sendo utilizados anticorpos policlonais dos principais grupos antigênicos de arbovírus de ocorrência no Brasil, incluindo os representantes das cinco principais famílias e principais gêneros dos arbovírus, sendo estas: (*Togaviridae*, *Alphavirus*): grupo **A**; (*Flaviviridae*, *Flavivirus*): grupo **B**; (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*): grupos **C**, Simbú, Guamá, Capim e Bunyawera; (*Bunyaviridae*, *Phlebovirus*): Phlebotomus; (*Reoviridae*, *Orbivirus*): Changuinola; (*Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*): VSV.

Para análise das informações foi considerada a espécie da ave capturada, o “status” de migratória ou residente, o tipo de anticorpo detectado pela técnica de IH, o tipo de reação (RM – reação monotípica, RC- reação cruzada heterotípica) e o resultado do PRNT.

5.3 RESULTADOS

Na área de estudo foi possível registrar a presença de 41,21% (143/347) das espécies já catalogadas no bioma Caatinga de acordo com Pacheco & Bauer (2000). Foram capturadas 363 aves silvestres, sendo que 121 aves das espécies *Columbina minuta* e *Columbina picui*, foram liberadas logo após caírem em grandes bandos nas redes próximas às aguadas, em virtude da quantidade limitada de técnicos para os procedimentos de anilhamento e coleta de sangue. As 242 aves silvestres restantes pertenciam a 38 espécies, e dessas foi possível coletar e encaminhar ao IEC/PA 46 amostras de soro, com uma taxa de coleta de 18,93%. As amostras de soro corresponderam a 16 espécies, 42,10% (16/38) do total de espécies capturadas no estudo, e 4,61% (16/347) do total de espécies descritas no bioma Caatinga. Das 46 amostras de soro encaminhadas, 13 amostras não foram testadas devido a quantidade insuficiente de soro, resultando em 33 amostras submetidas ao teste IH. Dessas, 27 foram negativas e 18,18% (6/33) foram reagentes para, pelo menos, um dos arbovírus testados, sendo mais frequente as reações heterotípicas (4/6), com dois terços das amostras apresentando anticorpos contra mais de um Flavivírus. A detecção de anticorpos anti-VNO foi a mais frequente e representou 83,33% (5/6) das amostras reagentes. Ainda que 60,0% das reações positivas (3/5) para VNO tenham sido do tipo heterotípica, outros 40,0% (2/5, um exemplar de cada uma das espécies *Myiarchus tyrannulus* e *Mimus saturninus*) apresentaram reação monotípica. Os outros arbovírus que apresentaram reação positiva foram: Ilhéus 50,0% (3/6); Saint Louis 50,0% (3/6); Bussaquara 16,67% (1/6) e Febre Amarela 16,67% (1/6), sugerindo a possibilidade de reação cruzada entre os Flavivírus, considerando que, por exemplo, a febre amarela só foi registrada no Nordeste do Brasil no início do século XX (COSTA et al., 2010) (Tabela 1).

A técnica de neutralização por redução de placas (PRNT) utilizada nas seis amostras positivas no teste IH, apresentou resultados positivos para VNO em três amostras de espécies residentes: *Columbina talpacoti*, *Piaya cayana* e *Turdus rufiventris*, destacando a importância da participação de espécies silvestres de aves residentes no ciclo de transmissão do VNO no Brasil, tendo em vista que os resultados nas aves foram obtidos na mesma área onde ocorreu o primeiro caso humano de VNO (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados sorológicos das espécies de aves silvestres submetidas à pesquisa de anticorpos anti-VNO (Vírus do Nilo Ocidental) e outros arbovírus pelas técnicas de Inibição de Hemaglutinação (IH) e de neutralização por redução de placas (PRNT). Bahia, 2014

| Espécies | Amostras | IH positivo para VNO, titulação e tipo de reação | IH positivo para outros arbovírus e titulação | PRNT VNO |
|--------------------------------------|-----------|--|--|----------|
| <i>Columbina minuta</i> * | 1 | 0 | 0 | - |
| <i>Columbina picui</i> * | 6 | 0 | 0 | - |
| <i>Columbina squammata</i> * | 3 | 0 | 0 | - |
| <i>Columbina talpacoti</i> * | 1 | 1 (1:80) Heterotípica | Febre amarela 1:20; Ilheus 1:80; Saint Louis 1:80; Bussuquara 1:20 | Positivo |
| <i>Zenaida auriculata virgatta</i> * | 4 | 0 | 0 | - |
| <i>Piaya cayana</i> *** | 1 | 1 (1:20) Heterotípica | Saint Louis 1:40 | Positivo |
| <i>Glaucidium brasilianum</i> ** | 1 | 0 | 0 | - |
| <i>Picumnus pygmaeus</i> ** | 1 | 0 | 0 | - |
| <i>Myiarchus tyrannulus</i> ** | 4 | 1 (1:40) Monotípica | 0 | Negativo |
| <i>Pitangus sulphuratus</i> *** | 2 | 0 | 0 | - |
| <i>Pachyramphus polychopterus</i> ** | 1 | 0 | 0 | - |
| <i>Myiodynastes maculatus</i> ** | 1 | 0 | 0 | - |
| <i>Mimus saturninus</i> *** | 1 | 1 (1:40) Monotípica | 0 | Negativo |
| <i>Turdus amaurocholinus</i> *** | 2 | 0 | 0 | - |
| <i>Turdus rufiventris</i> *** | 3 | 1 (1:80) Heterotípica | Ilheus 1:20 | Positivo |
| <i>Cyclarhis gujanensis</i> *** | 1 | 0 Heterotípica | Ilheus 1:40; Saint Louis 1:40 | Negativo |
| Total: | 33 | | | |

Fonte: Pedro Cerqueira Lima

Notas: Locais de preferência das espécies: * capoeira (áreas degradadas pelo homem para formação de áreas de habitação, lavoura, pomar e pasto, com poucas árvores e arbustos nativos); ** borda de mata; *** nos dois ambientes

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados são relevantes, em vista da ampla distribuição geográfica das espécies *Columbina talpacoti* (+ IH e PRNT), *Piaya cayana* (+ IH e PRNT), *Myiarchus tyrannulus* (+ IH), *Mimus saturninus* (+ IH) e *Turdus rufiventris* (+ IH e PRNT) e do potencial que representam para a dispersão do VNO no Brasil e demais países da América Latina. Observa-se na Tabela 1, que a distribuição ecológica dos arbovírus, de acordo com as espécies de aves soropositivas, foi predominante nas áreas de capoeira e borda de mata; não havendo registro positivo para arbovírus em espécies de aves que ocorrem no interior de matas preservadas. Este

fato necessita ser melhor elucidado, especialmente, em relação à ecologia das espécies de mosquitos ornitofílicos vetores destes vírus. De acordo com os resultados, a presença de aves positivas nas áreas mais antropizadas, borda de mata e capoeira, associada à ocorrência constante de insetos vetores nas áreas com habitações humanas, podem explicar a ocorrência do primeiro caso humano de FNO no Brasil e serve como um alerta sobre o quanto as populações tanto rurais quanto urbanas estão expostas a eventuais surtos de FNO, tendo em vista que as espécies de aves positivas também ocorrem em grandes centros.

A espécie *Columbina talpacoti* (Rolinha-roxa, Ruddy Ground-Dove), família *Columbidae*, apresenta duas subespécies. *C. t. rufipennis* (Bonaparte, 1855), com ocorrência no Brasil (estado do Amazonas), México, América Central e Venezuela e a subespécie *C. t. talpacoti* (Temminck, 1811), com ocorrência em todo o Brasil, Guianas, Equador, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e em parte do Peru. O resultado soropositivo foi registrado na subespécie *C. t. talpacoti*. Seu possível envolvimento na epidemiologia da FNO pode ser relevante, inclusive pela sua presença numerosa em grandes centros urbanos. DIAZ et al. (2011), na Argentina, relataram resultado soropositivo para VNO na espécie *Columbina picui* (Temminck, 1813).

No Brasil, a subespécie *Columbina picui strepitans* (Spix, 1825) (Rolinha-branca, Picui Ground-Dove) é amplamente distribuída. No presente estudo, as seis amostras de soro examinadas resultaram negativas.

A espécie *Piaya cayana* (Alma-de-gato, Squirrel Cuckoo), família *Cuculidae*, conta com seis subespécies no Brasil, distribuídas em diversos biomas, sendo que *P. c. pallescens* (Cabanis & Heine, 1862), positiva para VNO nesse estudo, ocorre no bioma Caatinga (Grantsau, 2010).

A espécie *Myiarchus tyrannulus* (Maria-cavaleira-de-rabo-enferrujado, Brown-crested Flycatcher), família *Tyrannidae*, apresenta duas subespécies no Brasil, *M. t. bahiae*, positiva para VNO, ocorre no bioma Caatinga nos estados do Piauí, Pernambuco, Ceará, Alagoas e Bahia (Grantsau, 2010).

A espécie *Mimus saturninus* (Sabiá-do-campo, Tropical Mockingbird), família *Mimidae*, conta com quatro subespécies no Brasil, sendo que *M. s. arenaceus* (Chapman, 1890) e *M. s. frater* (Hellmayr, 1903) ocorrem no bioma Caatinga, sendo que não foi identificada qual das duas resultou positiva para VNO nesse estudo.

A espécie *Turdus rufiventris* (Sabiá-laranjeira, Rufous-bellied Thrush), família Turdidae, conta com duas subespécies no Brasil, *T. r. rufiventris* (Viellot, 1818) e *T. r. juensis* (Cory, 1916), essa última com ocorrência no bioma Caatinga, apresentou resultado soropositivo para VNO. *Turdus rufiventris* também apresentou resultado positivo para VNO na Argentina (DIAZ et al., 2011).

Considerando que a espécie Tordo-americano (*Turdus migratorius*), na América do Norte e Caribe é o principal reservatório do VNO (KOMAR et al., 2003; KILPATRICK et al., 2006a,b), espécies do mesmo gênero, no Brasil, como *Turdus rufiventris*, *T. amaurocholinus* e *T. leucomelas*, devem ser incluídas em futuros estudos epidemiológicos sobre o VNO, em vista de ocorrerem com frequência em centros urbanos.

Apesar da subespécie *Zenaida auriculata virgatta* (avoante, arribaçã, arribação ou pomba-de-bando, Eared Dove) ter apresentado resultado negativo no presente estudo, apenas quatro espécimes foram capturados (4/242), o que não é representativo, considerando que essa espécie migratória ocorre em bandos com milhares de indivíduos na área do estudo, após o período de chuvas. Nos locais de pouso para beber água, ou nos sítios de alimentação e reprodução dessa espécie, milhares de exemplares costumam ser caçados, sendo um importante item na alimentação das populações nas suas áreas de ocorrência (NOBREGA et al., 2012).

O homem diagnosticado com FNO (VIEIRA et al., 2015), anteriormente mencionado, caçava essa espécie nas proximidades de sua residência, onde existem três lagos e um rio em um raio de 500 metros. Apesar de estar muito impactada pela agricultura, a presença de corpos hídricos pode favorecer a proliferação de possíveis insetos vetores de VNO, mesmo no período de seca. O VNO, também pode ser transmitido por manipulação e ingestão de aves, mamíferos e répteis infectados (GLAZER, 2004; ZELLER & SCHUFFENECKER, 2004). Há registros, na Argentina, de exemplares soropositivos para VNO da mesma subespécie (DIAZ et al., 2011). Nos EUA, a espécie *Zenaida macroura* é considerada como importante amplificador do VNO (SCOTT et al., 2006).

Nos trópicos, a biodiversidade da avifauna é elevada e inclui muitas espécies com baixa capacidade de amplificação do VNO, o que diminui as chances de infecção dos insetos vetores, reduzindo a transmissão do vírus às aves e aos humanos (SWADDLE & CALOS, 2008; ARTSOB et al., 2009) o que pode explicar a dispersão mais lenta do VNO na América do Sul, em comparação ao que ocorreu na América do Norte. Com base nesta hipótese, a ocorrência de

cinco espécies de aves soropositivas para o VNO, até o momento, no bioma Caatinga pode estar associada ao fato da avifauna neste bioma apresentar menor biodiversidade em comparação com outros biomas brasileiros.

A evidência sorológica de infecção por outros quatro flavivírus (febre amarela, Saint Louis, Ilheus e Bussuquara) em três das cinco espécies de aves soropositivas para VNO, nesse estudo (Tabela 1), reforça a hipótese de que a letalidade provocada pelo VNO é relativamente baixa nas espécies suscetíveis nas zonas tropicais do continente Sul Americano, em vista da elevada diversidade de espécies de flavivírus circulantes em animais silvestres, domésticos e na população humana (GUBLER, 2007; SABATTINI *et al.*, 1998). Sob essas condições, no caso de uma infecção por VNO, a interação com anticorpos contra possíveis outros flavivírus, em coinfeção ou decorrentes de infecções pregressas, resulte na modulação da manifestação clínica, bem como, da viremia associada à infecção por VNO, contribuindo para a redução da letalidade e da transmissão do vírus nos trópicos (GUBLER, 2007). Novos estudos poderão testar essas hipóteses e esclarecer a real diversidade de espécies de animais susceptíveis e reservatórias do VNO no continente americano.

Estes resultados representam a primeira evidência do VNO em passeriformes residentes no Brasil e sugerem que o vírus se espalhe a partir das aves migratórias que frequentam os mesmos pontos de parada que aquelas que efetuam migração mais curta ou as residentes, mantendo a infecção nos mosquitos vetores, a exemplo do que ocorre com espécies do gênero *Columbina* (residentes) e *Zenaida auriculata* (migratória), ambas encontradas, compartilhando o mesmo ambiente de forrageio, acesso à água e locais de reprodução na área de estudo, o que pode favorecer a dispersão do vírus entre as espécies.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); a Zildomar Souza Magalhães pela ajuda nas pesquisas de campo, aos profissionais das Secretarias Municipais de Saúde de Itainópolis, Aroeiras do Itaim e Regional de Saúde de Picos; aos técnicos da Secretaria Estadual de Saúde e do Laboratório Central de Saúde do estado do Piauí; ao apoio do Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das Aves Silvestres/CEMAVE; ao Instituto Evandro Chagas (IEC); à Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde; ao CDC pela doação das quimeras. Um agradecimento especial aos membros da comunidade de Aroeira do Iram que participaram e contribuíram com as pesquisas de campo (Apêndice 6).

REFERÊNCIAS

- ARTSOB, H.; GUBLER, D. J.; ENRIA, D. a.; MORALES, M. a.; PUPO, M.; BUNNING, M. L.; DUDLEY, J. P. West Nile virus in the new world: Trends in the spread and proliferation of West Nile virus in the western Hemisphere. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 357–369, 2009.
- BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J.-C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A. E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L. West Nile virus, Venezuela. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 651–653, 2007.
- CDC, C. for D. C. and P. Average annual incidence of West Nile virus neuroinvasive disease reported to CDC by county, 1999-2012. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/westnile/resourcepages/pubs.html>>.
- CLARKE, H.; CASALS, J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 7, p. 561–573, 1958.
- COSTA, Z. G. A.; RAMARO, A. P.; ELKHOURY, A. N. M.; FLANNERY, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 11–26, 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- DIAZ, L. A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; JURI, M. J. D.; STEIN, M.; ALLENDE, R. L.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W.; CONTIGIANI, M. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689–691, 2008.
- DIAZ, L.; QUAGLIA, A.; FLORES, F.; CONTIGIANI, M. Virus West Nile En Argentina : Un Agente Infeccioso. **Hornero**, v. 26, n. 1, p. 5–28, 2011.
- EARLY, E.; PERALTA, P.; JOHNSON, K. A plaque neutralization method for arboviruses. **Proc Soc Exp Biol**, v. 25, p. 741–747, 1967.
- GLAZER, A. West Nile virus and North America: an unfolding story. **Rev Sci Tech**, p. 557–568, 2004.
- GRANTSAU, R. **Guia completo para identificação das aves do Brasil**. 1. ed. São Paulo: Editora Vento Verde, 2010.
- GUBLER, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 8, p. 1039–1046, 2007.
- GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158–165, 1984. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1984.33.158>>. Acesso em: 19 abr. 2017.
- HAYES, C. G.; MONATH, T. P. The arboviruses: epidemiology and ecology. **CRC Press**, p. 55–88, 1989.

KILPATRICK, a M.; CHMURA, A. a; GIBBONS, D. W.; FLEISCHER, R. C.; MARRA, P. P.; DASZAK, P. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19368–19373, 2006.

KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S.; NEMETH, N.; EDWARDS, E.; HETTLER, D.; DAVIS, B.; BOWEN, R. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, p. 311–322, 2003.

MELANDRI, V.; GUIMARÃES, A. É.; KOMAR, N.; NOGUEIRA, M. L.; MONDINI, A.; FERNANDEZ-SESMA, A.; ALENCAR, J.; BOSCH, I. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.

NOBREGA, V. a; BARBOSA, J. a a; ALVES, R. R. N. Utilização de aves silvestres por moradores do município de Fagundes, Semiárido paraibano: uma abordagem etno-ornitológica. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 11, n. 2, p. 165–175, 2012.

OMETTO, T.; DURIGON, E. L.; DE ARAUJO, J.; APRELON, R.; DE AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; MELO, R. M.; LEVI, J. E.; JUNIOR, S. M. d. A.; PETRY, M. V.; NETO, I. S.; SERAFINI, P.; VILLALOBOS, E.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. d. C. C. S. H.; NAVA, A. F. D.; NARDI, M. S.; HURTADO, R.; RODRIGUES, R.; SHERER, A. L.; SHERER, J. d. F. M.; GERALDI, M. P.; DE SEIXAS, M. M. M.; PETERKA, C.; BANDEIRA, D. d. S.; PRADEL, J.; VACHIERY, N.; LABRUNA, M. B.; DE CAMARGO, L. M. A.; LANCIOTTI, R.; LEFRANCOIS, T. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013.

Disponível em: <<http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/trstmh/trt081>>.

PACHECO, J. F. .; BAUER, C. As aves da caatinga: apreciação histórica do processo de conhecimento. In: Seminário Biodiversidade da Caatinga, Petrolina. **Anais...** Petrolina: 2000.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M. A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M. F.; DA SILVA, E. E.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.

PLATONOV, A. E.; KARAN', L. S.; SHOPENSKAIA, T. A.; FEDOROVA, M. V.; KOLIASNIKOVA, N. M.; RUSAKOVA, N. M.; SHISHKINA, L. V.; ARSHBA, T. E.; ZHURAVLEV, V. I.; GOVORUKHINA, M. V.; VALENTSEVA, A. A.; SHIPULIN, G. A. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 2, p. 29–37, 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/21598612>>.

SABATTINI, M. S.; AVILES, G.; MONATH, T.; MONATH, T. **Historical, Epidemiological and Ecological Aspects of Arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae** Instituto Evandro Chagas. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=MAILLIL&lang=p&exprSearch=BR275.1&>>.

- SCOTT, T.; LEE, P.; PAGGETT, K.; CARNEY, R. The Impact of West Nile Virus on Birds in California ' s Hardwood Rangelands. **GENERAL TECHNICAL REPORT PSW-GTR**, p. 151–163, 2006. Disponível em: <http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw_gtr217/psw_gtr217_151.pdf>.
- SHOPE, R. E. The use of a micro hemagglutination inhibition test to follow antibody response after arthropod- borne virus infection in a community of forest animals. *Annual Microbiology*. **Annual Microbiology**, p. 167–171, 1963.
- SILVA, J. R.; DE MEDEIROS, L. C.; DOS REIS, V. P.; CHAVEZ, J. H.; MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A. B.; DE CAMPOS, C. H. C.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D.; SILVA, M. L. C. R.; FARIA, J. L. M.; DA SILVA, E. E.; FIGUEIREDO, L. T. M. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921–923, 2013.
- SMITHBURN, K. C.; HUGHES, T. P.; BURKE, A. W.; PAUL, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 20, p. 472–472, 1940.
- STEINMAN, A.; BANET-NOACH, C.; TAL, S.; LEVI, O.; SIMANOV, L.; PERK, S.; MALKINSON, M.; SHPIGEL, N. West Nile virus infection in crocodiles. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 7, p. 887–889, 2003.
- SWADDLE, J. P.; CALOS, S. E. Increased Avian Diversity Is Associated with Lower Incidence of Human West Nile Infection: Observation of the Dilution Effect. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. e2488, 2008.
- TAURO, L.; MARINO, B.; DIAZ, L. A.; LUCCA, E.; GALLOZO, D.; SPINSANTI, L. Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 553–556, 2012.
- TBER, A. West Nile fever in horses in Morocco. **Bull Off Int Epizoot**, p. 867–869, 1996.
- TSAI, T.; POPOVICI, F.; CERNESCU, C.; CAMPBELL, G.; NEDELICU, N. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. **The Lancet**, v. 352, n. 9130, p. 767–771, set. 1998.
- Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673698035387>>. Acesso em: 5 dez. 2015.
- ULLOA, A.; LANGEVIN, S. A.; MENDEZ-SANCHEZ, J. D.; ARREDONDO-JIMENEZ, J. I.; RAETZ, J. L.; POWERS, A. M.; VILLARREAL-TREVIÑO, C.; GUBLER, D. J.; KOMAR, N. Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest region of Chiapas, Mexico. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 3, n. 1, p. 3–9, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804375>>. Acesso em: 4 dez. 2015.
- VIEIRA, M. C. e S.; AGUIAR, A. de A. X.; BORBA, A. de S.; LIMA, H. C. west Nile fever in Brazil : sporadic case , silent endemic disease or epidemic in its initial stages? **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 57, n. 3, p. 276, 2015.
- ZELLER, H. G.; SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 147–156, 2004.

6 ARTIGO CIENTÍFICO II

Epizootia em aves silvestres de ambiente aquático de vida livre causada por *Clostridium botulinum*, Brasil.

RESUMO

Em janeiro de 2008, centenas de aves silvestres de ambiente aquático foram encontradas mortas ou debilitadas nas margens de pequenos lagos isolados formados em decorrência da diminuição do nível do Lago da Represa de Sobradinho, localizado no Rio São Francisco, no Município de Remanso, estado da Bahia, Brasil. A maioria das aves encontradas pertenciam a 16 espécies pertencentes principalmente às famílias Anatidae (50,0%) e Ardeidae (12,5%). Todas as aves debilitadas apresentavam sinais clínicos neurológicos de falta de coordenação motora, fraqueza e paralisia flácida grave nas pernas, asas, pescoço e pálpebras, além de diarreia e dispneia. A investigação do agente causal abrangeu a coleta de amostras biológicas de aves debilitadas e mortas para o diagnóstico virológico e bacteriológico. Amostras de água e substrato dos pequenos lagos foram analisadas para a presença de metais pesados, e bactérias patogênicas. O diagnóstico das espécies de vírus suspeitos foi negativo, bem como, os índices detectados de metais pesados estavam nos níveis admitidos pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). No entanto, a análise das amostras, pela técnica de soroneutralização em camundongos, revelou a presença de toxina botulínica dos tipos C e D. Este resultado representa o primeiro registro de surto de botulismo em aves silvestres de vida livre no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Toxina botulínica, botulismo, aves silvestres, ambiente aquático.

ABSTRACT

In January of 2008, hundreds of wild birds from aquatic environments were found dead or debilitated along the shores of small, isolated lakes which formed after the decrease in the level of the reservoir of the Sobradinho Lake, located in São Francisco River in the municipality of Remanso, the state of Bahia. The aim of the study was to investigate the cause of this epizootic phenomenon referred to above. The majority of the birds found were mainly from the Anatidae (50.0%) and Ardeidae (12.5%) families. All the debilitated birds showed neurological clinical signs such as lack of motor skills, weakness and grave flaccid paralysis in the legs, wings, neck and eyelids as well as diarrhea and dyspnea. The investigation of the causal agent encompassed the collection of biological samples of the dead and debilitated birds for virological and bacteriological diagnosis. Water and substrate samples from the small lakes were analyzed for the presence of heavy metals (Appendix 6). The microbiological diagnosis was negative and the indices of heavy metal detection were within the levels stipulated by CONAMA (National Council on the Environment/Health Ministry). Through the sero-neutralization technique performed on mice, the presence of the botulinum toxin types C and D were found in representatives of the Anatidae Family and in the substrate. This study is the first register of the outbreak of botulism in free wild birds in Brazil.

KEY WORDS: Botulinim toxin, *Clostridium botulinum*, botulism, wild birds, aquatic environment.

6.1 INTRODUÇÃO

Surtos com elevada mortalidade em aves silvestres de vida livre podem ser atribuídos a diferentes causas, a exemplo de infecções virais (FULLER et al., 2010; DELIBERTO et al., 2009); e bacterianas (WOBESER, 1997), bem como, a intoxicações por metais pesados (JONES et al., 1983). No presente estudo, a mortalidade de aves silvestres de ambiente aquático registrada, no estado da Bahia, Brasil, foi atribuída a um surto de botulismo (Apêndice 7) O botulismo em animais e humanos é causado por uma das toxinas mais potentes encontra na natureza, a toxina botulínica, produzida pelo *Clostridium botulinum*, bactéria Gram positiva anaeróbica. Sete tipos de *C. botulinum* são atualmente nomeados com as letras de A a G de acordo com a especificidade sorológica da toxina produzida (AUSTIN, 2001). Os tipos A, B, E estão associados à casuística humana e os tipos C, A e D são encontrados no botulismo animal (HEDELAND et al., 2011). Os esporos de *C. botulinum* podem ser encontrados em ambiente terrestre e aquático (água doce ou marinha) em todo o mundo. As maiorias dos surtos de botulismo ocorrem durante o verão, quando as temperaturas são elevadas (YULE et al., 2006). No ambiente aquático, há diversos relatos de surto de botulismo em criação de peixes (HUSS et al, 1974; CANN et al. 1982). O botulismo em humanos causado pelo *C. botulinum* tipo E, tem sido associado ao consumo de peixes e mamíferos aquáticos (HAUSCHILD et al., 1993; COLLINS et al., 1998). Apesar de *C. botulinum* tipo E ter sido associado, quase exclusivamente, com ambientes aquáticos, surtos deste tipo de botulismo entre aves aquáticas selvagens e pássaros de ambiente litorâneo são raros. Kaufmann et al. (1964) relataram um surto de botulismo do tipo E entre mergulhões e gaivotas no lago Michigan, em 1963. *C. botulinum* tipo E foi reportado no conteúdo intestinal de peixe retirados dos Grandes Lagos (BOTT et al., 1966). No entanto, a toxicologia do botulismo em peixes ainda precisa melhor elucidada (YULE et al., 2006). Peixes mortos podem contribuir para a ocorrência de botulismo tipo E, com a proliferação do *C. botulinum* e produção de elevados níveis de toxina botulínica, independentemente da causa inicial da morte (CANN et al. 1982; EKLUND et al., 1984). Invertebrados também podem atuar como vetores de transporte da toxina botulínica tipo E, o que tem sido demonstrado em caracóis, minhocas e pequenos nematoides (HUSS et al, 1974; YULE et al., 2006). O botulismo do tipo C é considerado o principal causador de botulismo em aves (WOBESER, 1997). Mortalidade de aves aquáticas, geralmente, é causada pela toxina botulínica tipo C, podendo também ocorrer surtos esporádicos em aves que se alimentam de peixes, tais como mergulhões e gaivotas comuns, causados pela toxina do tipo E (MONHEIMER, 1968; BRAND et al., 1988). A toxina do tipo A tem sido associada aos casos

de intoxicação alimentar. No Brasil, o primeiro caso de botulismo, em humano, notificado ao Ministério da Saúde ocorreu em 1999 e, até 2004, houve 41 casos suspeitos notificados, sendo 18 casos de botulismo alimentar. A toxina botulínica tipo A foi responsável por 77,8% dos surtos de botulismo alimentar no país (EDUARDO, 2002). Dutra & Döbereiner (1995), em surto descrito por eles, atribuíram a contaminação ambiental pelas toxinas botulínicas C e D à contaminação pelo *Clostridium botulinum* de cadáveres em decomposição expostos no pasto. A inexistência de legislação específica sobre a destruição e destinação adequada de cadáveres nos sistemas de produção animal do país, a ausência de ações de educação sanitária pelos órgãos oficiais e o pouco conhecimento por parte dos produtores das consequências sanitárias e econômicas de se deixar cadáveres em decomposição na pastagem, favorecem a ocorrência da intoxicação (CURCI et al., 2007). As toxinas botulínicas do complexo C e D foram relatadas como as causadoras de surtos de botulismo em ruminantes que se alimentavam de cama-de-frango (DUTRA et al., 2005).

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

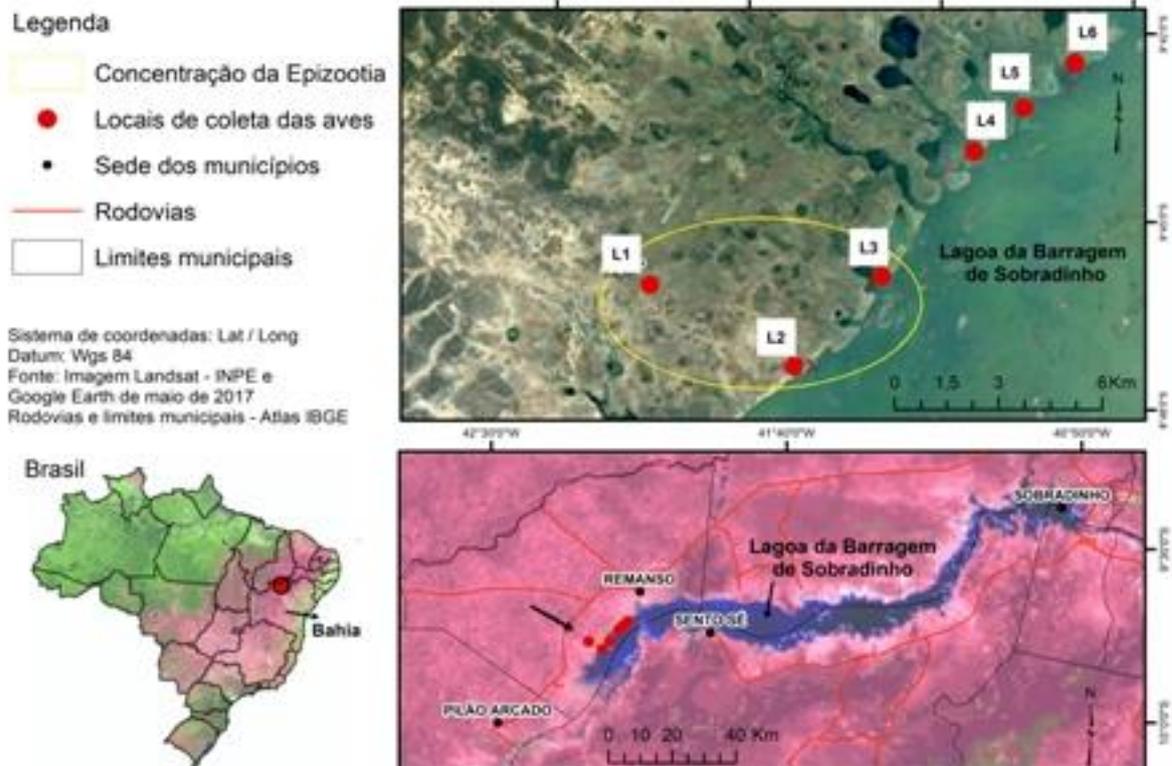
O estudo foi realizado, em áreas no entorno do Lago da Represa de Sobradinho, localizado no Rio São Francisco, Município de Remanso, estado da Bahia, Brasil. O município de Remanso fica às margens do Lago da Represa de Sobradinho e conta com uma área de 4.694 km², com população estimada em 38.957 habitantes (IBGE, 2016). A região está inserida no Bioma Caatinga. A economia da cidade se baseia no comércio e na agropecuária (feijão, pesca, ovinos e caprinos). No período do estudo, o lago da represa encontrava-se com 19,0% de sua capacidade de armazenamento de água em virtude da seca. Esta redução do nível da água proporcionou a formação de pequenos lagos rasos, isolados, com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e um baixo teor de oxigênio livre, onde as aves mortas e debilitadas foram encontradas (Figura 16). Cinco desses pequenos lagos (EPI 1 a 5) foram incluídos no estudo (Figura 17). O inquérito sobre as mortes e aves debilitadas foi executado pelo Ministério da Saúde com a participação de técnicos especializados, e teve como primeiro objetivo verificar o possível risco para a população humana, animal e ambiental, e o possível envolvimento de viroses emergentes como Influenza Aviária e Febre do Nilo Ocidental infectando as aves.

Figura 16. A esquerda, Lago da Represa de Sobradinho, Rio São Francisco, município de Remanso, Bahia, Brasil, em período de seca, com apenas 19,0% de sua capacidade de armazenamento de água. A direita, aves debilitadas, coletadas em lagoas rasas, formadas pela redução do nível de água do lago da represa, 2008.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Figura 17. Cinco áreas de lagoas rasas (L1 a L5), formadas, em virtude da seca, pela redução do nível de água do Lago da Represa de Sobradinho, localizado no Rio São Francisco, no Município de Remanso, estado da Bahia, Brasil, onde a mortalidade de aves foi investigada. L1 (Fazenda Pageú), L2 (Lab1), L3 (Balões), L4 (Via aparecida), L5 (Riacho Carnaúba) e L6 (Lagoa Carnaúba-feijão).



Fonte: Ricardo Lustosa e Pedro Cerqueira Lima

O levantamento geral da avifauna da área de estudo, incluindo as encontradas mortas ou debilitadas, foi realizado por meio de observação a olho nu ou com uso de binóculos *Swarovski* 8X30. Para identificação das espécies foi considerado características morfológicas, comportamentais e vocalizações. Os sons das aves foram gravados com microfone direcional Sennheiser ME-66 e um gravador digital MP3 Edirol. Foi utilizado a técnica do reconhecimento auditivo, reproduzindo uma gravação de áudio do canto e/ou chamado de uma determinada espécie para estimular a aproximação da respectiva ave ou sua resposta vocal (MOTTA-JUNIOR et al., 2010). A taxonomia e nomenclatura das espécies registradas seguiram as normas do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos/CRBO (CBRO, 2014), e para o nível de subespécies utilizou-se a taxonomia proposto no livro Guia Completo para Identificação das Aves do Brasil (GRANTS AU, 2010). Características como endemismo e hábito alimentar seguiram as orientações do livro de Ornitologia Brasileira (SICK, 1997).

Foi registrado um total de 270 aves silvestres entre mortas (n=225) e debilitadas (n=45). Foram coletadas amostras biológicas das 45 aves debilitadas: sangue de (n=40), swabs cloacal (n=27) e vísceras (n=43): cérebro, coração, pulmão, fígado e rins. As amostras foram conservadas a campo em nitrogênio líquido.

Alíquotas de amostras biológicas de 45 aves encontradas debilitadas foram enviadas para o Instituto Evandro Chagas, estado do Pará (instituto de referência no Brasil no diagnóstico viral), para pesquisa de isolamento de 19 arbovírus diferentes e/ou sorologia dos mesmos. Foi investigada também a presença de vírus de influenza aviária, pelo LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário/ Ministério da Aricultura, Pecuária e Abastecimento) em vista o número elevado de aves encontradas mortas ou debilitadas pertencentes à ordem Anseriformes (patos, gansos, cisnes) a qual é sensível ao vírus da influenza (DELIBERTO et al., 2009).

Para o isolamento viral foram utilizados cultivos celulares (células C6/36- clone *Aedes albopictus* e VERO - rim de macaco-verde-africano), nos quais foram inoculadas as amostras coletadas nas aves, e observados diariamente para visualização de efeito citopatogênico. A confirmação da presença do vírus em células infectadas foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), descrita por Gubler et al., (1984), sendo utilizados anticorpos policlonais dos principais grupos antigênicos de arbovírus de ocorrência no Brasil, incluindo os representantes das cinco principais famílias (e principais gêneros) dos arbovírus, sendo estas: (*Togaviridae*, *Alphavirus*): grupo A; (*Flaviviridae*, *Flavivirus*): grupo B; (*Bunyaviridae*,

Orthobunyavirus): grupos C, Simbú, Guamá, Capim e Bunyawera; (*Bunyaviridae*, *Phlebotomus*): Phlebotomus; (*Reoviridae*, *Orbivirus*): Changuinola; (*Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*): VSV.

Para avaliar o possível envolvimento da contaminação da água na mortalidade das aves na região por resíduos oriundos de empresas mineradoras, agricultura e esgoto urbano nas proximidades do Lago da Represa de Sobradinho (Apêndice 8), foram coletadas amostras de água, substratos, algas e caramujos, enviadas para análise de metais pesados, bacteriológica e físico-química da água no Laboratório da CETREL (Empresa de Proteção Ambiental do Polo Petroquímico de Camaçari, Bahia) (Anexo 2). Para os exames de metais pesados foram coletados 4,5l de água em três dos lagos estudados (EPI 1-5). As amostras de água foram acondicionadas em frascos âmbar de 1,5 litros, devidamente identificados e conservados em gelo. Os metais pesados foram analisados em espectrômetro de absorção atômica, através do método SMEWW 3120 B (Boro, Bário, Berílio, Cálcio, Cádmi, Cobalto, Cromo, Cobre, Ferro, Potássio, Lítio, Magnésio, Molibdênio, Manganês, Sódio, Níquel, Chumbo, Silício, Estanho, Estrôncio, Tálcio, Vanádio, Zinco, Arsênio, Mercúrio, Antimônio e Selênio) (Anexo 3).

As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis, devidamente identificados e conservados em gelo. Amostras de sedimento (limo), algas e caramujos foram coletadas nos cinco lagos e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados e conservados em gelo. O material foi encaminhado ao Laboratório da CETREL no período de 24 horas. Para os exames microbiológicos e físico-químico foram coletados 500 ml de água de três dos cinco lagos estudados, a escolha foi aleatória. Foram analisados: Cianeto Livre, Condutividade, DQO-RF, Índice de Fenóis, Análise de pH, Surfactantes, CR. IÔNICA, Cloreto, Fluoreto, N-Nitrato, N-Nitrito, Sulfato (Anexo 1). Em vista dos sinais clínicos observados nas aves debilitadas serem também sugestivos de botulismo, amostras de diferentes espécies de patos (Família Anatidae), (Anexo 4) nas quais a mortalidade foi mais expressiva, bem como, amostras de sedimento (limo), algas e caramujos foram coletadas nos cinco lagos, conservadas refrigeradas e prontamente enviadas para o Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araçatuba/SP, para análise de toxina botulínica, pela técnica de bioensaio em camundongos (segundo preconizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention – CDC/USA*) e soroneutralização em camundongo e para a presença de esporos de *C. botulinum*

pelas técnicas de inoculação dos materiais em meio de cultura CMM (*Cooked Meat Medium*), bioensaio em camundongos e soroneutralização (Anexo 4).

6.3 RESULTADOS

O levantamento geral da avifauna na região de estudo identificou o total de 24 Famílias e 64 espécies. Dessas espécies (64), 17 (26,6%) são consideradas migratórias, 43 (67,2%) residentes e 4 (6,3%), com características residentes e/ou migratórias a depender das mudanças no ambiente úmido (Tabela 2).

Foram encontradas 270 aves silvestres debilitadas ou mortas pertencentes a 16 espécies, sendo 225 (83,3%) aves mortas e 45 (16,7%) debilitadas.

Das 16 espécies, 68,8% (11/16) eram migratórias, 12,5% (2/16) residentes e duas espécies 12,5% (2/16); *Aramus guarauna* e *Podilymbus podiceps* tanto podem ser residentes quanto migratórias a depender das condições ambientais.

Tabela 2 Famílias e espécies de aves identificadas na área de estudo, discriminadas quanto ao número de indivíduos debilitados+mortos, hábito alimentar e local de forrageamento em relação à lâmina d'água das pequenas lagoas junto ao Lago da Represa de Sobradinho, município de Remanso, Bahia, 2008. (continua..)

| Família / Espécie | Debilitada e Morta | Alimentação | Local de forrageamento |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| Podicipedidae | | | |
| <i>Podilymbus podiceps</i> | 1 | Peixes e insetos | L R* |
| Phalacrocoracidae | | | |
| <i>Phalacrocorax brasilianus</i> | 2 | Peixes | “ |
| Ardeidae | | | |
| <i>Egretta thula</i> | 27 | Peixes e anfíbios | “ |
| <i>Bubulcus íbis</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Nycticorax nycticorax</i> | 1 | “ | “ |
| <i>Butoridis striatus</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Ardea cocoi</i> | 0 | “ | L F** |
| <i>Ardea alba</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Tigrisoma lineatum</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Mycteria americana</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Jabiru mycteria</i> | 0 | “ | “ |

Tabela 2 Famílias e espécies de aves identificadas na área de estudo, discriminadas quanto ao número de indivíduos debilitados+mortos, hábito alimentar e local de forrageamento em relação à lâmina d'água das pequenas lagoas junto ao Lago da Represa de Sobradinho, município de Remanso, Bahia, 2008.

| (continuação) | | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| Família / Espécie | Debilitada e Morta | Alimentação | Local de forrageamento |
| Anatídea | | | |
| <i>Dendrosygna autumnalis</i> | 96 | Filtradores | L R |
| <i>Dendrosygna viduata</i> | 68 | “ | “ |
| <i>Amazonetta brasiliensis</i> | 35 | “ | “ |
| <i>Dendrosygna bicolor</i> | 4 | “ | “ |
| <i>Cairina moschata</i> | 3 | “ | “ |
| <i>Netta erythrophthalma</i> | 3 | “ | “ |
| <i>Anas bahamensis</i> | 2 | “ | “ |
| <i>Sarkidiornis melanotos</i> | 2 | “ | “ |
| Aramidae | | | |
| <i>Aramus guaraúna</i> | 2 | Molusco aquático | L R |
| Rallidae | | | |
| <i>Gallinula chloropus</i> | 0 | Onívora | S*** |
| <i>Porphyrio flavirostris</i> | 0 | “ | “ |
| Jacanidae | | | |
| <i>Jacana jacana</i> | 2 | Insetos e anfíbios | L R |
| Recurvirostridae | | | |
| <i>Himantopus mexicanus</i> | 6 | Insetos/larvas | “ |
| Charadriidae | | | |
| <i>Vanellus chilensis</i> | 16 | “ | “ |
| <i>Charadrius collaris</i> | 0 | “ | “ |
| Sternidae | | | |
| <i>Phaetusa simplex</i> | 0 | Peixes | S |
| Cathartidae | | | |
| <i>Coragyps atratus</i> | 0 | Necrófago | M**** |
| <i>Cathartes aura</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Cathartes burrovianus</i> | 0 | “ | “ |
| Accipitridae | | | |
| <i>Rupornis magnirostris</i> | 0 | Rapinante | M |
| <i>Rostrhamus sociabilis</i> | 0 | Molusco aquático | S |
| Falconidae | | | |
| <i>Caracara plancus</i> | 0 | Rapinante | M |
| <i>Mivalgo chimachima</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Falco femoralis</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Falco sparverius</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Falco peregrinus</i> | 0 | “ | “ |
| Columbidae | | | |
| <i>Columbina minuta</i> | 0 | Sementes | M |
| <i>Columbina picui</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Columbina squammata</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Columbina talpacoti</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Leptotila verreauxi</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Patagioenas picazuro</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Zenaida auriculata</i> | 0 | “ | “ |
| Cuculidae | | | |
| <i>Crotophaga ani</i> | 0 | Onívora | “ |
| <i>Guira guira</i> | 0 | “ | “ |

Tabela 2 Famílias e espécies de aves identificadas na área de estudo, discriminadas quanto ao número de indivíduos debilitados+mortos, hábito alimentar e local de forrageamento em relação à lâmina d'água das pequenas lagoas junto ao Lago da Represa de Sobradinho, município de Remanso, Bahia, 2008. (conclusão)

| Família / Espécie | Debilitada e Morta | Alimentação | Local de forrageamento |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| Nyctibiida | | | “ |
| <i>Chordeiles pusilus</i> | 0 | Insetos | “ |
| Picidae | | | |
| <i>Ceryle torquatus</i> | 0 | Peixes | S |
| Furnariidae | | | |
| <i>Certhiixys cinnamomeus</i> | 0 | Insetos e larvas | S |
| <i>Furnarius rufus</i> | 0 | “ | S/ M |
| <i>Furnarius figulus</i> | 0 | “ | S |
| Tyrannidae | | | |
| <i>Fluvicola albiventer</i> | 0 | Insetos | “ |
| <i>Fluvicola nengeta</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Pitangus sulphuratus</i> | 0 | Onívora | “ |
| <i>Tyrannus melancholicus</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Tyrannus savanna</i> | 0 | “ | M |
| Hirundinidae | | | |
| <i>Progne tapera</i> | 0 | “ | S/ M |
| <i>Progne subis</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Hirundo rustica</i> | 0 | “ | “ |
| <i>Tachycineta albiventer</i> | 0 | “ | “ |
| Mimidae | | | |
| <i>Mimus saturninus</i> | 0 | Onívora | M |
| Cardinalidae | | | |
| <i>Paroaria domicana</i> | 0 | Sementes | “ |
| Passeridae | | | |
| <i>Passer domesticus</i> | 0 | Onívora | “ |
| Icteridae | | | |
| <i>Sturnella superciliaris</i> | 0 | Onívora | S/ M |
| Famílias =24. Espécies = 64 | | n = 270 de 16 espécies | |

Fonte: Pedro Cerqueira Lima

Legenda: * LR = na lâmina d'água rasa; ** LF = lâmina d'água funda; *** S = na superfície d'água e ****M = nas margens.

Considerando o hábito alimentar das espécies identificadas, observam-se, em ordem decrescente do número de indivíduos debilitados+mortos, que as Famílias Anatídea (78,9%, 213/270), Ardeidae (10,4%, 28/270), Charadriidae (5,9% 16/270) e Recurvirostridae (2,2%, 6/270) foram as mais atingidas, com destaque para a famílias Anatídea (aves filtradoras), na qual foram registrados indivíduos debilitados e mortos em todas as suas oito espécies identificadas no levantamento da avifauna na área de estudo. Das nove espécies identificadas da família Ardeidae, a Garça-branca-pequena (*Egretta thula*) foi a espécies que apresentou quase a totalidade dos casos de morte ou debilitação. Na família Charadriidae, das duas espécies identificadas, apenas o Quero-quero (*Vanellus chilensis*) apresentaram indivíduos debilitados

ou mortos. Na família Recurvirostridae, o Maçarico-de-perna-longa (*Himantopus mexicanus*) se destaca, também pelo número de casos registrados (Tabela 2) As 45 aves de 11 espécies encontradas debilitadas apresentavam bom estado nutricional, porém, com sinais de apatia, sem capacidade de locomoção e voo, conjuntiva ocular seca, paralisia da membrana nictante e edema ocular, asas abertas, pescoço caído e morriam num curto período de tempo. As amostras biológicas enviadas ao Instituto Evandro Chagas, estado do Pará, não revelaram a presença de vírus da Febre do Nilo Ocidental ou outras arboviroses, bem como, foi descartada a presença H5N1 pelo LANAGRO/MAPA, ou outra cepa virulenta de vírus de influenza aviária.

As análises de metais pesados realizadas nos laboratórios da CETREL mostraram que os níveis desses elementos/substâncias nas amostras investigadas estavam dentro dos limites preconizados pelos CONAM (Conselho Nacional do Meio 2016)/Ministério da Saúde. Estes resultados, apesar de se referirem aos níveis de toxicidade admissíveis para humanos, sugerem que os itens analisados não teriam papel causal na mortalidade das aves na área de estudo, além disso, com exceção das aves, não foram encontradas outras espécies de animais mortos associados aos pequenos lagos estudados. Os exames microbiológicos e físico-químicos revelaram que os lagos estavam eutrofizados.

Na pesquisa direta de toxina botulínica dos materiais biológicos das diferentes espécies de patos, encontrados mortos, foi identificada a toxina botulínica do tipo C, normalmente envolvida no botulismo em aves (Tabela 3). Nas amostras de sedimento das lagoas foi identificada a presença de esporos de *C. botulinum* e as toxinas C e D, esta última, normalmente envolvida na mortalidade de peixes, além disso, foi registrada uma toxina botulínica não tipificada. As amostras de moluscos e algas coletadas na área de estudo foram negativas para a presença de esporos e toxina botulínica.

Tabela 3. Resultado da pesquisa direta de toxina botulínica pelo teste de bioensaio, segundo técnica do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) e neutralização em camundongo, dos materiais biológicos das diferentes espécies de patos encontrados mortos. Diagnósticos realizados no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Unesp-Campus de Araçatuba, SP, 2008.

| Espécies de patos | Toxina | Moela | Conteúdo intestinal | Fígado |
|-------------------------------|--------|-------|---------------------|--------|
| <i>Amazoneta brasiliensis</i> | Tipo C | - | + | + |
| <i>Amazoneta brasiliensis</i> | Tipo C | + | + | + |
| <i>Dendrocygna autumnalis</i> | Tipo C | - | + | + |
| <i>Denseicygna autumnalis</i> | | - | - | + |
| <i>Dendrocygna autumnalis</i> | | ■ | ■ | - |
| <i>Dendrocygna viduata</i> | | - | - | - |
| <i>Dendrocygna viduata</i> | | ■ | ■ | ■ |
| <i>Dendrocygna viduata</i> | | - | - | - |

Fonte: **Iveraldo dos Santos Dutra.**

*As amostras marcadas em vermelho continham toxina botulínica para provocar sintomas nos camundongos, mas sem provocar óbito. Pela técnica eles são tidos como negativos, mesmo tendo sido neutralizados pela antitoxina C.

Na área de estudo foi observada a presença de centenas de abutres (família Cathartidae), das espécies: Urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), Urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) e Urubu-de-cabeça-amarela (*Cathartes burrovianus*) que se alimentavam das carcaças das aves mortas (Figura 18). Os membros dessa família são necrófagos, resistentes ao botulismo, cólera e ao antraz, as possíveis explicações para a resistência dos abutres aos patógenos foram descritas por Carvalho et al. (2003). No presente estudo, não foram encontradas aves dessa família debilitadas ou mortas, o que corrobora as observações feitas por outros autores sobre a resistência ao botulismo (KALMBACH, 1939; HOLDEMAN, 1970 SMITH et al., 1982). Foram observadas a presença de duas espécies de aves de rapina, Gavião-carrapateiro (*Mivalgo chimachima*) e o Carcará (*Caracara plancus*), se alimentando das carcaças frescas das aves. Apesar disso, também não foram encontrados indivíduos destas espécies debilitados ou mortos.

Figura 18. A esquerda, Urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aurea*) e a direita, uma carcaça de Irerê (*Dendrocygna viduata*), destrocada pelos abutres na área de estudo, próximo ao Lago da Represa de Sobradinho, Município de Remanso, Bahia/ Brasil, 2008.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

6.4 DISCUSSÃO

No presente estudo não foi detectada a presença ou intoxicação por metais nas amostras analisadas em níveis capazes de provocar a debilidade ou morte as aves. O envenenamento por chumbo causa sinais neurológicos que podem assemelhar aos sintomas do botulismo: fraqueza, andar em círculo, movimento circular dos olhos, balanço rítmico da cabeça, convulsões, ataxia, paralisia, inclinação da cabeça, cegueira e depressão severa (JONES et al., 1983). Apesar da presença de empresas mineradoras na região do rio São Francisco os índices de metais pesados encontrados nas amostras estavam dentro dos parâmetros admissíveis. No entanto não é possível descartar a possibilidade de interações entre essas substâncias e outros agentes causais no aumento da susceptibilidade e fragilização dos animais.

As análises realizadas no Instituto Evandro Chagas não identificaram nem a presença de anticorpos ou mesmo de arboviroses, nem o LANAGRO detectou a presença de cepas patogênicas do vírus da influenza aviária. A ocorrência de mortalidade em aves é sempre um alerta sobre o risco para a saúde humana e para a produção avícola de uma região e o possível envolvimento de viroses emergentes tem prioridade nas investigações, as aves ocupam a terceira posição como fonte de isolamento de arbovírus, seguido de humanos e roedores (ARAUJO et al., 2012).

É importante o diagnóstico diferencial quando ocorre surtos em populações de aves acompanhado de elevada mortalidade, considerando que possa estar relacionado a diversas etiologias como: Febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses (que infectam aves, equinos e humanos), influenza aviária e botulismo aviário (SPACKMAN et al., 2002; MANAROLLA et al., 2009; WŁODARCZYK et al., 2014) bem como a presença de demais espécies do gênero *Flavivirus* (SCARAMOZZINO et al., 2001) que também causam fenômenos de mortalidade.

Apesar da maior mortalidade das aves ter ocorrido durante o presente estudo em 2008, outros períodos também registraram casos de morte em aves na região, 2012, 2013 e 2015. Na área de estudo não houve relato sobre a morte de outros animais na região, apesar dos animais de produção (equinos, bovinos e ovinos) consumir a água dos lagos onde haviam aves debilitadas e mortas, possivelmente em virtude dos animais domésticos normalmente serem vacinados contra o botulismo na região, o que indica a presença endêmica do botulismo. Segundo Dutra et al. (2001) e Souza et al. (2006) a ingestão de água contaminada com toxina botulínica pode causar um quadro letal de botulismo nesses animais de produção. Existem situações em que pelas características e condições epidemiológicas, permite-se associar a ingestão de água contaminada à ocorrência de surtos de botulismo (DUTRA et al., 1990) Intoxicações botulínicas associadas à ingestão de água foram descritos acometendo bovinos no Senegal (DOUTRE, 1969; THIONGANE et al., 1984) e em búfalos no Brasil (LANGENEGGER et al., 1988). Na África do Sul é mencionada a ocorrência de surtos de botulismo em bovinos e ovinos, com o envolvimento de centenas de animais (KRIEK et al., 1994).

As amostras de moluscos e algas coletadas na área de estudo foram negativas para a presença de esporos e de toxina botulínica. As amostras de sedimento dos pequenos lagos revelaram a presença de esporos de *C. botulinum* e toxina botulínica dos tipos C e D, além de uma toxina botulínica não tipificada. As pesquisas nas amostras retiradas de três espécies de patos revelaram a presença de toxina botulínica tipo C em amostras de moela, conteúdo estomacal e fígado (Tabela 2), essa toxina geralmente é associada ao botulismo aviário (YULE et al., 2006), enquanto que a toxina tipo A e D estão associadas à contaminação e mortalidade em peixes. Na Índia, pesquisas realizadas em amostras de peixes crus em estabelecimentos varejistas de Cochin detectaram a presença de *C. botulinum* e toxinas dos tipos A e D com uma prevalência de 19,0% nos peixes comercializados.

A incidência de *C. botulinum* em camarões foi de 25,0%. Dentre as toxinas, as dos tipos A e D foram prevalentes nos peixes frescos, e as dos tipos C e D foram as predominantes nos produtos curados. Em 21 amostras analisadas de camarão salgado desidratado 10 amostras (48,0%) hospedavam a toxina botulínica do tipo D (LALITHA et al., 2002). O botulismo provoca doença e mortalidade em aves selvagens (FORRESTER et al., 1980; WOBESER, 1997), o que é documentado em diversos países em aves aquáticas (Anseriformes; FORRESTER et al., 1980, WOBESER et al., 1983; (SHAYEGANI et al., 1984; WOBESER, 1997), aves marinhas (Charadriiformes; FORRESTER et al., 1980), gaviotas (*Larus argentatus*; NEIMANIS et al., 2007), e não aquáticas a exemplo de galinhas (*Gallus gallus*; DOHMS, 1982).

A baixa profundidade dos corpos d'água, aliada a uma diminuição na quantidade de oxigênio dissolvido, aumento da temperatura e presença de sedimentos em decomposição são fatores importantes, considerando que *Clostridium botulinum* é anaeróbio, se beneficiando destas condições ambientais para sua multiplicação e liberação de suas toxinas (ROCKE et al., 2007). De acordo com Rocke et al. (2007), as espécies de animais invertebrados desempenham um importante papel na mediação da transferência de toxinas a partir de materiais orgânicos para os patos selvagens que os ingerem por filtração o que pode esclarecer o fato das aves da família Anatidae terem sido no presente surto as mais atingidas.

Os resultados apresentados nesse estudo revelam o primeiro caso de botulismo aviário em aves silvestres de vida livre em ambiente aquático no Brasil. Apesar dessa doença ser bem estudada em animais de produção, seu impacto nas espécies de animais de vida livre ainda é desconhecido no país, e devem ser pesquisados, visando tanto a conservação de espécies silvestres quanto a correção dos procedimentos de eliminação de carcaças a campo dos animais de produção por parte dos criadores, o que contribuiria para a redução da contaminação ambiental por *Clostridium botulinum*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); Aos profissionais das Secretarias Municipais de Saúde de Remanso, aos veterinários e técnicos da ADAB que ajudaram na pesquisa de campo. Ao apoio do Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das Aves Silvestres/CEMAVE; ao Instituto Evandro Chagas (IEC); à Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, em especial aos colegas Alessandro Pecego romano, Pedro Henrique de Oliveira Passos, Daniel Garkauskas. Aos colegas da Secretaria de Saúde da Bahia – SES/BA, DIVEP, DIRES/JUAZEIRO Agencia de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB (ESCRITÓRIO DE JUAZEIRO E REMANSO). Centro de Recursos Ambientais da Bahia – CRA ESCRITÓRIO DE JUAZEIRO. Secretaria de Saúde de Remanso – SMS Vigilância Sanitária, Vigilância Epidemiológica. CETREL - Empresa de Monitoramento do Meio Ambiente do Polo Petroquímico de Camaçari/BA. Universidade Federal da Bahia – UFBA. Aos colegas que contribuíram nos trabalhos de campo: Aramis Cardoso Beltrami – CGVAM/SVS/MS, Charles E.A. Oliveira – ADAB/JUAZEIRO, Edmar de Souza Freire – ADAB/REMANSO. Erivelton Souza Almeida – DAB/REMANSO Bruno R.P.D. Silva – CRA/JUAZEIRO, Erilson Rodrigues Azevedo – DIVISA/SMS/REMANSO. Marcos Jesuino L. Nogueira – CCZ/CAMACARI. Aos membros da Colônia de Pescadores de Remanso. Edgar Pinho Cerqueira – DIVEP/SES/BA

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, F. A. A.; LIMA, P. C.; ANDRADE, M. A.; JAYME, V. D. S.; RAMOS, D. G.; SILVEIRA, S. L. DA. Soroprevalência de anticorpos “anti-arbovírus” de importância em saúde pública em aves selvagens, Brasil - 2007 e 2008. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 115–123, 2012.
- AUSTIN, J. W. **Clostridium botulinum. in food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2nd Edition ed. Washington: Press, ASM, 2001. v. 42
- BOTT, T. L.; DEFFNER, J. S.; MCCOY, E.; FOSTER, E. M. Clostridium botulinum type E in fish from the Great Lakes. **J. Bacteriol**, v. 91, p. 919–924., 1966.
- BRAND, C. J.; SCHMITT, S. M.; DUNCAM, R. M.; COOLEY, T. M. An outbreak of type E botulism among common loons (*Gavia immer*) in Michigan’s upper peninsula. **J. Wildl. Dis.**, v. 24, p. 471–476, 1988.
- CANN, D. C.; TAYLOR, L. Y. An outbreak of botulism in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, farmed in Britain. **Journal of Fish Diseases**, v. 5, p. 393–399, 1982.
- CARVALHO, L. R. de; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R.; SILVA, M. C. F.; CORSINO, A. T. S. M.; LIMA, L. A.; REDONDO, R. A. F.; FERREIRA, P. C. P.; PINTO, M. E. B. M. Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of the American black vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and search for antagonistic substances. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 218–224, 2003.
- CBRO (COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS). **Listas das aves do Brasil**. 11° ed. Brasília: Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2014.
- COLLINS, M.; EAST, A. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. **J Appl Microbiol**, v. 1, n. 84, p. 5–17, 1998.
- CURCI, V. C. L. M.; DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; JUNIOR, J. L. Pré-compostagem de cadáveres de bovinos acometidos pelo botulismo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 4, p. 157–161, 2007.
- DELIBERTO, T. J.; SWAFFORD, S. R.; NOLTE, D. L.; PEDERSEN, K.; LUTMAN, M. W.; SCHMIT, B. B.; BAROCH, J. a.; KOHLER, D. J.; FRANKLIN, A. Surveillance for highly pathogenic avian influenza in wild birds in the USA. **Integrative zoology**, v. 4, n. 4, p. 426–439, 2009.
- DOHMS, J. E.; CLOUD, S. S. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. **Avian Dis**, v. 26, p. 89–96, 1982.
- DOUTRE, M. . Fréquence au Sénégal du botulisme animal d’origine hydrique. v. **Élèv. Med. Vet. Pays Trop.**, v. 1, n. 22, p. 29–31, 1969.

DUTRA, I. .; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; BOND, V. Botulismo de origem hídrica em bovinos no Brasil. In: 16th World Buiatrics Congress, Salvador- BA. **Anais...** Salvador- BA: 1990.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. Eficácia da Vaxall - vacina botulínica bivalente - na prevenção do botulismo em bovinos. **Hora Veterinária**, v. 93, p. 22–26, 1995.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, L. A. A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43–48, 2001.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115–119, 2005.

EDUARDO, M. B. P. et al. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: clostridium botulinum/botulismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002.

EKLUND, F. T.; POYSKY, M. E.; PETERSON, L. W.; BRUNSON, W. D. Type E botulism in salmonids and conditions contributing to outbreaks. **Aquaculture**, v. 41, p. 293–309, 1984.

FORRESTER, J. D.; WENNER, K. C.; WHITE, F. H.; GREINER, C. E.; MARION, W. R.; TIJUL, J. E.; BERKOFF, A. G. An epizootic of avian botulism in a phosphate mine settling pond in northern Florida. **J. Wildl. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 323–327, 1980.

FULLER, T. L.; SAATCHI, S. S.; CURD, E. E.; TOFFELMIER, E.; THOMASSEN, H. a; BUERMANN, W.; DESANTE, D. F.; NOTT, M. P.; SARACCO, J. F.; RALPH, C.; ALEXANDER, J. D.; POLLINGER, J. P.; SMITH, T. B. Mapping the risk of avian influenza in wild birds in the US. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 187, 2010.

GRANTS AU, R. **Guia completo para identificação das aves do brasil**. 1º ed. São Paulo: Vento Verde, 2010.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158–165, 1984. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1984.33.158>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

HAUSCHILD, A. H. W.; DODDS, K. L. **Clostridium botulinum ecology and control in foods**. New York: Marcel Dekker Inc, 1993.

HEDELAND, M.; MOURA, H.; BÅVERUD, V.; WOOLFITT, A. R.; BONDESSON, U.; BARR, J. R. Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1299–1305, 2011.

HOLDEMAN, L. V. The ecology and natural history of Clostridium botulinum. **J. Wildl. Dis.**, v. 6, p. 205–10, 1970.

HUSS, H. H.; ESKILDSEN, U. Botulism in farmed trout caused by *Clostridium botulinum* type E. **Vet. Med.**, v. 26, p. 733—8, 1974.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Infográficos: dados gerais do município da Remanso, Bahia. **O cidades**, 2016.

JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

KALMBACH, E. R. American vultures and the toxin of *Clostridium botulinum*. **J. Am. Vet. Med.**, v. 94, p. 187–91, 1939.

KAUFMANN, O. W.; FAY, L. D. *Clostridium botulinum* type E toxin in tissues of dead loons and gulls. **Exp. Sta. Quart. Bull**, v. 47, p. 236–42, 1964.

KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W.; J.A.W., C.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. Botulism. In: **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. 2. ed. Cape Town: Oxford University Press, 1994. p. 1605.

LALITHA, K. V.; SURENDRAN, P. K. Occurrence of *Clostridium botulinum* in fresh and cured fish in retail trade in Cochin (India). **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1–2, p. 169–174, 2002.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. **Pesq. Vet. . Bras**, v. 1/2, p. 37/42, 1988.

MANAROLLA, G.; BAKONYI, T.; GALLAZZI, D.; CROSTA, L.; WEISSENBO, ck. H.; DORRESTEIN, G.; NOWOTNY, N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. **Vet Microbiol**, v. 141, p. 159–163, 2009.

MONHEIMER, R. H. The relationship of Lake Michigan waterbird mortalities to naturally occurring *Clostridium botulinum* type E toxin. **Bull. Wildl**, 1968.

MOTTA-JUNIOR, J. C.; GRANZINOLLI, M. A. M.; MONTEIRO, A. R. Miscellaneous ecological notes on Brazilian birds of prey and owls. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 355–360, 2010.

NEIMANIS, A.; GAVIER-WIDÉN, D.; LEIGHTON, F.; BOLLINGER, T.; ROCKE, T.; MÖRNER, T. An outbreak of type C botulism in herring gulls (*Larus argentatus*) in southeastern Sweden. **Journal of wildlife diseases**, v. 43, n. 3, p. 327–36, 2007.

ROCKE, T. E.; BOLLINGER, T. K. Avian botulism. **Infectious diseases of wild birds**, p. 377–416, 2007.

SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J.; JOUAN, A.; DEBRIEL, D.; STOLL, F.; GARIN, D. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 1922–1927, 2001.

SHAYEGANI, M.; STONE, W. B.; HANNETT, G. E. An outbreak of botulism in waterfowl and fly larvae in New York State. **J Wildl Dis**, v. 20, n. 2, p. 86–89, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6737616>.

SICK, H. **Ornitologia brasileira - edição revista e ampliada por j. f. pacheco**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1997.

SMITH, A. G. **Handbook of pesticidae toxicology**. 2. ed. Califórnia: Academic Press, 1991.

SMITH, G. R.; OLIPHANT, J. C.; WHITE, W. R. Clostridium botulinum type C in the Mersey estuary. **Journal of Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 507, 1982.

SOUZA, A. M.; MARQUES, D. F.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, a M.; MARQUES, D. F.; DÖBEREINER, J.; SPORES, D. I. S. Esporos e toxinas de Clostridium botulinum dos tipos C e D em cacimbas no Vale do Araguaia, Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 133–138, 2006.

SPACKMAN, E.; SENNE, D.; MYERS, T.; BULAGA, L.; GARBER, L.; PERDUE, M.; LOHMAN, K.; DAUM, L.; SUAREZ, D. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 40, p. 3256–60, 2002.

THIONGANE, Y.; LEFORBAN, Y.; DOUTRE, M. . Le botulisme de type D au Sénégal. Un nouveau foyer d'origine hydrique responsable d'une forte mortalité. **Rev. Élèv. Med. Vet. Pays Trop.**, v. 2, n. 37151–154, 1984.

WŁODARCZYK, R.; MINIAS, A. P.; KUKIER, E.; GREUDA, T.; ŚMIETANKA, K.; JANISZEWSKI, T. The First Case of a Major Avian Type C Botulism Outbreak in Poland. **American Association of Avian Pathologists**, v. 58, n. 3, p. 488–490, 2014.

WOBESER, G. AVIAN BOTULISM — ANOTHER PERSPECTIVE AVIAN. **Wildlife Disease Association**, v. 33, n. 2, p. 181–186, 1997.

WOBESER, G.; RAINNIE, D. J.; SMITH-WINDSOR, T. B.; BOGDAN, G. Avian botulism during late autumn and early spring in Saskatchewan. **J Wildl Dis**, v. 19, n. 2, p. 90–94, 1983.

WOO, G.-H.; KIM, H.-Y.; BAE, Y.-C.; JEAN, Y. H.; YOON, S.-S.; BAK, E.-J.; HWANG, E. K.; JOO, Y.-S. Outbreak of botulism (Clostridium botulinum type C) in wild waterfowl: Seoul, Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 951–955, 2010.

YULE, A. M.; BARKER, I. K.; AUSTIN, J. W.; MOCCIA, R. D. Peixes dos grandes lagos: implicações para a botulismo aviária. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 3, n. 42, p. 479–493, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

O estudo apresenta os primeiros registros de infecção por VNO e botulismo em aves silvestres de vida livre no Brasil. Esses resultados são relevantes para o avanço do conhecimento epidemiológico dessas zoonoses, contribuindo para o aperfeiçoamento das ações de prevenção e controle no país.

No tocante ao VNO, os resultados corroboram as observações feitas por outros autores que pesquisaram essa virose em países Latino-americanos (tropicais e subtropicais), onde os impactos na saúde pública e na biodiversidade foram reduzidos em comparação à elevada morbidade e letalidade em humanos e em diferentes espécies de aves silvestres de vida livre registradas nos EUA, o que desperta o interesse científico na pesquisa a respeito da influência da diversidade da avifauna e das espécies de arbovírus, já circulantes no Brasil, sobre a virulência do VNO, tendo em mente o papel da imunidade cruzada em hospedeiros expostos a diferentes espécies de vírus.

Apesar do conhecimento sobre a epidemiologia do botulismo em humanos e animais de produção estar avançado, no Brasil, os dados sobre a ocorrência dessa zoonose em aves silvestres são ainda incipientes. Os resultados desse estudo demonstram que eventuais casos de mortalidade de aves de ambiente aquáticos podem estar relacionados à presença de toxinas botulínicas. A ignorância sobre este fato sugere que os estudos epidemiológicos, até então realizados, se restringiram aos casos de botulismo de interesse econômico ou de saúde pública, contribuindo pouco para uma compreensão mais sistêmica dessa zoonose, inclusive sobre seu impacto na avifauna, especialmente sobre as espécies de aves de ambiente aquático. É importante ressaltar a necessidade de realizar trabalhos de comunicação em saúde, tendo em vista que as pessoas estão expostas à toxina botulínica ao ingerirem, tanto as aves e peixes quanto a água nas áreas afetadas, além disso, é fundamental a adoção de medidas sanitárias como a incineração ou enterro das carcaças dos animais, afim de reduzir a contaminação da área com esporos de *Clostridium botulinum*.

APÊNDICES

Apêndice 2 - Espécies de aves da América do Norte que já foram acometidas com a FNO.



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)



(7)



(8)

(1) - *Catharus fuscescens* ; (2) - *Cyanocitta cristata*; (3)- *Corvus brachyrhynchos*; (4) - *Dumetella carolinensis* ; (5) - *Hirundo hustica*; (6)- *Sturnus vulgaris*, (7) - *Turdus migratorius* (ninho) e (8) - *Turdus migratorius*.

Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Apêndice 3 – Monitoramento do VNO no Município de Aroeiras do Itaim/Piauí.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Apêndice 4 – Coleta de material biológico durante a investigação da FNO no Piauí.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima e Pollyanna Cardoso Araújo

Apêndice 5 - Envolvimento das comunidades durante as pesquisas da FNO em Aroeira do Itaim Piauí /Brasil 2014. Aves silvestres criadas pela comunidade



Através do convencimento da comunidade pelos pesquisadores, foi possível resgatar as aves cativas para coleta de material biológico. Logos após a coleta as aves foram anilhadas e soltas.

Residência de Srº Francisco e membros da pesquisa com as aves silvestres.



Fotos: Pedro Cerqueira Lima e Pollyanna Cardoso Araújo

Apêndice 6 - Aves de ambiente aquático com sintomas de botulismo



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Apêndice 7 - Coleta de material biológico no lago da Barragem de Sobradinho/Bahia



Fotos: Pedro Cerqueira Lima

Apêndice 8 – Imagens de representantes da família *Anatidae* com sintomas de botulismo.



Fotos : Pedro Cerqueira Lima

Apêndice 9 – Local do estudo : Represa de Sobradinho/Bahia



Bando de patos silvestres sobrevoando o lago da Represa de Sobradinho/Bahia



Lago da represa de Sobradinho com volume baixo durante a seca de 2014.

Fotos : Pedro Cerqueira Lima

ANEXOS

Anexo 1 – Concessão de anilhamento CEMAVE/SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 33203-2 | Data da Emissão: 26/07/2014 16:22 | Data para Revalidação*: 24/08/2015 |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: PEDRO CERQUEIRA LIMA | CPF: 158.517.815-04 |
| Título do Projeto: ANILHAMENTO DE AVES EM TODO O BRASIL | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA | CNPJ: 15.180.714/0001-04 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|-------------------------------|------------------|---------------|
| 1 | ANILHAMENTO DE AVES NO BRASIL | 03/2013 | 03/2017 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa IBAMA nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação de legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DADOS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Outras ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | 1)O CEMAVE conduz atualmente monitoramento de aves na ESEC Reso da Catarina e, portanto, deverá ser contactado (83-32455001/3245-5278 ou snr.cemave@icmbio.gov.br) para que possa haver sinergia e/ou complementariedade das ações a fim de economizar recursos e produzir resultados integrados e de melhor qualidade. 2)Esta autorização não exime o titular de atender a IN 27 de 2002, que trata do Sistema Nacional de Anilhamento. 3)Deverão ser agendadas previamente com as equipes gestoras de UCs as expedições de campo de forma a compatibilizá-las com as atividades em andamento nestas unidades. |
|---|--|

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|---------------------------------------|----------|----------------|----------------------|---------------|
| 1 | Paulo César Costa Maia | AUXILIAR | 061.732.225-66 | 00728763 00 SSP-BA | Brasileira |
| 2 | ALCIBIO FERREIRA DA ROCHA NETO | auxiliar | 023.161.332-09 | 0849084326 SSP/BA-BA | Brasileira |
| 3 | WYBERS ROSALES CERQUEIRA LIMA NETO | auxiliar | 027.367.398-76 | 0832078620 SSP/BA-BA | Brasileira |
| 4 | RITA DE CÁSSIA FERREIRA DA ROCHA LIMA | auxiliar | 454.737.495-34 | 1244594 SSP/BA-BA | Brasileira |
| 5 | ZILDOMAR SOUZA MAGALHÃES | auxiliar | 561.838.434-66 | 0871027900 SSP-BA | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76288215



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 33203-2 | Data da Emissão: 26/07/2014 16:22 | Data para Revalidação*: 24/08/2015 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: PEDRO CERQUEIRA LIMA | CPF: 158.517.615-04 |
| Título do Projeto: ANILHAMENTO DE AVES EM TODO O BRASIL | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA | CNPJ: 15.180.714/0001-04 |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | tipo |
|----|-----------|----|---------------------------------------|--------------------|
| 1 | | AC | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 2 | | AL | Matas Atlântica e Caatinga | Fora da UC Federal |
| 3 | | AP | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 4 | | AM | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 5 | | CE | Matas Atlântica e Caatinga | Fora da UC Federal |
| 6 | | DF | Cerrado | Fora da UC Federal |
| 7 | | ES | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 8 | | GO | Cerrado | Fora da UC Federal |
| 9 | | MA | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 10 | | MT | Cerrado | Fora da UC Federal |
| 11 | | MS | Cerrado | Fora da UC Federal |
| 12 | | MG | Caatinga e Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 13 | | PA | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 14 | | PB | Caatinga | Fora da UC Federal |
| 15 | | PR | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 16 | | PE | Matas Atlântica e Caatinga | Fora da UC Federal |
| 17 | | PI | Cerrado e Caatinga | Fora da UC Federal |
| 18 | | RJ | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 19 | | RN | Caatinga | Fora da UC Federal |
| 20 | | RS | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 21 | | RO | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 22 | | RR | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 23 | | SC | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 24 | | SP | Matas Atlântica | Fora da UC Federal |
| 25 | | SE | Matas Atlântica e Caatinga | Fora da UC Federal |
| 26 | | TO | Floresta Amazônica | Fora da UC Federal |
| 27 | | BA | ESTÁÇÃO ECOLÓGICA NASO DA CATARINA | UC Federal |
| 28 | | BA | PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DIAMANTINA | UC Federal |
| 29 | | BA | PARQUE NACIONAL DE BOA NOVA | UC Federal |
| 30 | | BA | PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS | UC Federal |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|---------------------------------------|--|
| 1 | Captura de animais silvestres in situ | Áves, Pipridae, Jacanidae, Pedionomidae, Scolopacidae, Sturnidae, Gulidae, Troglodytidae, Tyrannidae, Ciconiidae, Passeridae, Fumariidae, Hirundinidae, Sylviidae, Cuculidae, Columbidae, Icteridae, Laniidae, Podicipedidae, Reidae, Alcedidae, Ardeinidae, Cardinalidae, Coccothraupidae, Coccothraupidae, Corvidae, Colapidae, Cotingidae, Cotingidae, Cotingidae, Diomedelidae, Thermophilidae, Tityridae, Caprimulgidae, Charadriidae, Chionidae, Procellariidae, Pelecanidae, Ramphastidae, Sturnidae, Phaeothropeidae, Polioptila, Acrididae, Embertidae, Turdidae, Fringillidae, Penelopeidae, Rostratulidae, Spheniscidae, Trogonidae, Estrildidae, Vireonidae, Buccconidae, Dendrocygnetidae, Ardeidae, Formicariidae, Falconidae, Fregatidae, Galbulidae, Phalacrocoracidae, Hydrobatidae |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76288215



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 33203-2 | Data da Emissão: 26/07/2014 16:22 | Data para Revalidação*: 24/08/2016 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: PEDRO CERQUEIRA LIMA | CPF: 158.517.615-04 |
| Título do Projeto: ANILHAMENTO DE AVES EM TODO O BRASIL | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA | CNPJ: 15.180.714/0001-04 |

| | | |
|---|--|--|
| 2 | Marcação de animais silvestres in situ | <p>Aves, Anhingidae, Chonidae, Cochlearidae, Crotophagidae, Cuculidae, Fumaridae, Trogonidae, Turdidae, Ciconiidae, Dendrocolaptidae, Galbulidae, Icteridae, Laridae, Phalaacrocoracidae, Pedionomidae, Tyrannidae, Emberizidae, Estrifidae, Pipridae, Sturnidae, Vireonidae, Corvidae, Diomedidae, Panulidae, Hirundinidae, Hydrobatidae, Jacanidae, Phaethontidae, Ploidae, Podicipedidae, Polioptilidae, Ramphastidae, Sphenacidae, Sulidae, Sylviidae, Thamnophilidae, Tityidae, Conopophagidae, Falconidae, Formicariidae, Fragatidae, Bucconidae, Charadriidae, Rostratulidae, Coccyzidae, Corvidae, Passeridae, Procellariidae, Scolopacidae, Troglodytidae, Columbidae, Fringillidae, Ptilidae, Stercorariidae, Accipitridae, Alcedidae, Ardeidae, Cardinalidae, Cathartidae</p> |
| 3 | Observação e gravação de imagem ou som | <p>Aves, Falconidae, Icteridae, Jacanidae, Ploidae, Podicipedidae, Polioptilidae, Rostratulidae, Accipitridae, Alcedidae, Ardeidae, Cardinalidae, Cathartidae, Charadriidae, Chonidae, Ciconiidae, Coccyzidae, Conopophagidae, Corvidae, Cochlearidae, Corvidae, Crotophagidae, Cuculidae, Diomedidae, Emberizidae, Estrifidae, Formicariidae, Fragatidae, Fringillidae, Pedionomidae, Phaethontidae, Ploidae, Fumaridae, Scolopacidae, Sulidae, Anhingidae, Panulidae, Passeridae, Procellariidae, Ptilidae, Ramphastidae, Phalaacrocoracidae, Stercorariidae, Sturnidae, Sylviidae, Hydrobatidae, Hirundinidae, Turdidae, Tyrannidae, Sphenacidae, Galbulidae, Thamnophilidae, Tityidae, Bucconidae, Dendrocolaptidae, Vireonidae, Troglodytidae, Trogonidae, Columbidae, Laridae</p> |

Material e métodos

| | | |
|---|---------------------------------|---|
| 1 | Método de captura/coleta (Aves) | Puça, Rede de neblina, Rede Bandeira, Captura manual |
| 2 | Método de marcação (Aves) | Anilha de Alumínio (padrão CEMAVE), Anilha de inox, Anilha colorida, Anilha de Alumínio Anodizada |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 76288215



Página 3/4

**Anexo 2 - Resultados das análises dos laboratórios de Biologia (Microbiologia e Microscopia)
da CETREL/Bahia,2008**

| | | | |
|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | RE-5.0-12-00-A-0756/2008 | |
| | | Rev: 00 | Data: 12/02/2008 |
| | | Folha: 1 / 2 | Responsável: 029-9 |

| | |
|--|-----------------------|
| Cliente: MINISTÉRIO DA SAÚDE Endereço: SCS Q.4 Bloco A Ed.Principal 2º Andar -Lote 67/67 Solicitante: Sr. Aramis Cardoso Referência: Conama 357 | CS: 5500 Proposta: |
|--|-----------------------|

| Laboratório Biologia - Microbiologia e Microscopia | | | | | | | | | |
|--|----------|--------------------|----------------------------------|-----------|-------------|---------------------------|-----------|-------------|--|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | Am.: Renato Fac. Paju Amostra 01 | | | Am.: Transição Amostra 02 | | | |
| | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise | |
| Bactérias Heterotóxicas | SM 9215B | 1,00E+01 UFC/mL | 7,95E+03 | UFC/mL | 1/2/2008 | 5,15E+03 | UFC/mL | 1/2/2008 | |
| M.F.Col.Totais | SM 9222B | 1,00E+01 UFC/100mL | +0,00E+03 | UFC/100mL | 1/2/2008 | 2,40E+03 | UFC/100mL | 1/2/2008 | |
| M.F.Col.Termotolerantes | SM 9222D | 1,00E+01 UFC/100mL | 6,00E+01 | UFC/100mL | 1/2/2008 | 2,00E+01 | UFC/100mL | 1/2/2008 | |

| |
|--|
| CETREL S/A - Empresa de Proteção Ambiental -CNPJ: 14.414.973/0001-81 Via Atlântica, Km V - Interligação Estrada do Córrego do Petróquímico- Cx.P.: 42810-000- Camaçari-Bahia-Brasil Fone (71) 9634-8832 Fax(71) 9634-8023 Home page : www.cetrel.com.br |
|--|

| | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------------------|--|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0758/2008 | |
| | Rev: 00 | Data: | 12/02/2008 | |
| | Folha: 2 / 2 | Responsável: | 629-9 | |

| Laboratório Biologia - Microbiologia e Microscopia | | | | | | | | | |
|--|----------|-----------|-----------|-------------------------------|-----------|-------------|---------|-------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amo.: Final Balões Amostra 03 | | | | | |
| | | | | Recult. | Unid. | Dt. Análise | Recult. | Unid. | Dt. Análise |
| Bactérias Heterotróficas | SM 9215B | 1,00E+0 | UFC/mL | >5,70E+05 | UFC/mL | 1/2/2008 | - | - | - |
| M.F.Col.Totais | SM 9222B | 1,00E+0 | UFC/100mL | >8,00E+03 | UFC/100mL | 1/2/2008 | - | - | - |
| M.F.Col.Termotolerantes | SM 9222D | 1,00E+0 | UFC/100mL | >1,20E+03 | UFC/100mL | 1/2/2008 | - | - | - |

Obs.:

- 1- UFC/100 mL - Unidade Formadora de Colônia de Coliformes Totais e/ou Coliformes Termotolerantes por 100 mL de amostra.
- 2- UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia por mL de amostra.
- 3- Bactérias Heterotróficas: Método Pour Plate, Meio de Cultura Ágar Plate Count, Incubação por (48±2) horas a (35,0±0,5)°C.
- 4- Coliformes Totais e/ou Termotolerantes: Técnica da Membrana Filtrante, Meio de Cultura m-Endo Agar Les (coliformes totais), m-FC Agar (coliformes termotolerantes), incubação por (24±2) horas a 35,0±0,5°C para coliformes totais e 44,5±0,2°C para coliformes termotolerantes.
- 5- Os resultados dos ensaios para Coliformes Totais nas amostras EX-0138/08 e EX-0140/08 foram expressos como >8000 (>8,0E+03), em função do crescimento conflúente (CCF) de UFC, no menor volume filtrado na análise (1 mL). Estes resultados foram estimados.
- 6- O resultado do ensaio para Coliformes Termotolerantes na amostra EX-0140/08 foi expresso como >1200 (>1,2E+03), em função do crescimento conflúente (CCF) de UFC, no menor volume filtrado na análise (5 mL). Este resultado foi estimado.
- 7- O resultado do ensaio para Bactérias Heterotróficas na amostra EX-0140/08 foi expresso como >570000 (>5,7E+05), em função do crescimento conflúente (CCF) de UFC, no menor volume filtrado na análise (0,01 mL). Este resultado foi estimado.
- 8- Resultados dos Controles de Qualidade: Os ensaios para Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes, através da Técnica de Membrana Filtrante, são acompanhados dos controles de qualidade: Branco (Controle da Esterilidade do Meio de Cultura e da Membrana Filtrante) -> Ausência de crescimento bacteriano. Controle da Esterilidade da Água de diluição -> Ausência de crescimento bacteriano (<1,0 UFC/100 mL). O ensaio para Bactéria Heterotrófica, através da Técnica de Pour Plate, é acompanhado dos controles de qualidade: Branco (Controle da Esterilidade da Capela de Fluxo Laminar e do Meio de Cultura) -> Ausência de crescimento bacteriano. Controle da Esterilidade da Água de diluição -> Ausência de crescimento bacteriano (<1,0 UFC/mL). Os resultados dos controles de qualidade garantem a confiabilidade dos resultados analíticos.
- 9- Crescimento Conflúente (CCF): Elevado crescimento bacteriano, com união das Unidades Formadoras de Colônias, cobrindo toda a área de filtração da membrana, impossibilitando a quantificação.
- 10- As amostras foram coletadas em recipientes inadequados e sem os reagentes específicos para a preservação.

Condições de Recebimento

| Amostra | Recipiente | Preservação | Quantidade | Observação | Resp.Amostragem |
|----------------|--------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 0138-ÁGUA - EX | Frasco Vidro | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |
| 0139-ÁGUA - EX | Frasco Vidro | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |
| 0140-ÁGUA - EX | Frasco Vidro | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |

Maria Leonor Brito de Santa Izabel
Biólogo - GELAB
C.R.Bio. No. 27.937/5-D

Eduardo dos Santos Fontoura
Gerente - GELAB
C.R.Q. No. 7100427

* O(s) resultado(s) expresso(s) neste relatório referem-se apenas à(s) amostra(s) encalada(s).

* O Laboratório não se responsabiliza pela coleta da(s) amostra(s).

* Este relatório só deverá ser reproduzido na íntegra. O Laboratório não se responsabiliza pela reprodução parcial deste relatório.

| | | | | |
|---|-----------------------------|--|--------------------------|--------------------|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0862/2008 | |
| | | | Rev: 00 | Data: 20/02/2008 |
| | | | Folha: 1 / 3 | Responsável: 629-9 |

| | |
|--|-----------------------|
| Cliente: MINISTÉRIO DA SAUDE Endereço: SCS Q.4 Bloco A Ed.Principal 2º Andar -Lote 67/97 Solicitante: Sr. Aramis Cardoso Referência: Conama 357 | CS: 5130 Proposta: |
|--|-----------------------|

| Laboratório Físico-química | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-----------|---------------|------------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------|---------------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amo.: Renato Faz. Pajeu Amostra 01 | | | Amo.: Transição Amostra 02 | | |
| | | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| | | | | Cód.: 0138/2008-ÁGUA - EX | | | Cód.: 0138/2008-ÁGUA - EX | | |
| | | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | |
| | | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | |
| | | | | Matriz: Água | | | Matriz: Água | | |
| Cianeto Livre | M QG1023 (3M4500- | 0,005 | mgCN/L | <0,005 | mgCN/L | 07/02/2008 | <0,005 | mgCN/L | 07/02/2008 |
| Condutividade | SMEWW 2510 B | 1 | µS/cm | 54 | µS/cm | 01/02/2008 | 47 | µS/cm | 01/02/2008 |
| DQO-RF | SMEWW 5220-D | 5 | mg O2/L | 6 | mg O2/L | 01/02/2008 | <5 | mg O2/L | 01/02/2008 |
| Índice de Fenóis | SEWW 5530 C | 0,01 | mg de fenol/L | 0,024 | mg de fenol/L | 13/02/2008 | 0,019 | mg de fenol/L | 13/02/2008 |
| Análise de pH | SMEWW 4500 H + | - | - | 8,1 | pH | 01/02/2008 | 8,3 | pH | 01/02/2008 |
| Surfactantes | SMEWW 5540 C | 0,05 | mg MBAS/L | 0,21 | mg/L M | 01/02/2008 | 0,29 | mg/L M | 01/02/2008 |
| CR. IÔNICA | | | | | | | | | |
| Cloreto | SMEWW 4110 B | 1 | mg Cl-L | 4 | mg Cl-L | 01/02/2008 | 2,4 | mg Cl-L | 01/02/2008 |
| Fluoreto | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg F-L | <0,1 | mg F-L | 01/02/2008 | <0,1 | mg F-L | 01/02/2008 |
| N-Nitrato | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO3/L | 0,1 | mg N-NO3/L | 01/02/2008 | <0,1 | mg N-NO3/L | 01/02/2008 |
| N-Nitrito | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO2/L | <0,1 | mg N-NO2/L | 01/02/2008 | <0,1 | mg N-NO2/L | 01/02/2008 |
| Sulfato | SMEWW 4110 B | 1 | mg SO4=L | <1 | mg SO4=L | 01/02/2008 | <1 | mg SO4=L | 01/02/2008 |

| | | | | |
|---|-----------------------------|--|--------------------------|--------------------|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0862/2008 | |
| | | | Rev: 00 | Data: 20/02/2008 |
| | | | Folha: 2 / 3 | Responsável: 629-9 |

| Laboratório Físico-química | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-----------|---------------|--------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------|---------------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amo.: Final Baldees Amostra 03 | | | Amo.: Lagos 01 Amostra 04 | | |
| | | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| | | | | Cód.: 0140/2008-ÁGUA - EX | | | Cód.: 0141/2008-ÁGUA - EX | | |
| | | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | |
| | | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | |
| | | | | Matriz: Água | | | Matriz: Água | | |
| Cianeto Livre | M QG1023 (3M4500- | 0,005 | mgCN/L | <0,005 | mgCN/L | 07/02/2008 | <0,005 | mgCN/L | 07/02/2008 |
| Condutividade | SMEWW 2510 B | 1 | µS/cm | 56 | µS/cm | 01/02/2008 | 91 | µS/cm | 01/02/2008 |
| DQO-RF | SMEWW 5220-D | 5 | mg O2/L | 8 | mg O2/L | 01/02/2008 | 57 | mg O2/L | 01/02/2008 |
| Índice de Fenóis | SEWW 5530 C | 0,01 | mg de fenol/L | 0,021 | mg de fenol/L | 13/02/2008 | 0,02 | mg de fenol/L | 13/02/2008 |
| Análise de pH | SMEWW 4500 H + | - | - | 8,9 | pH | 01/02/2008 | 8,3 | pH | 01/02/2008 |
| Surfactantes | SMEWW 5540 C | 0,05 | mg MBAS/L | 0,2 | mg/L M | 01/02/2008 | 0,13 | mg/L M | 01/02/2008 |
| CR. IÔNICA | | | | | | | | | |
| Cloreto | SMEWW 4110 B | 1 | mg Cl-L | 3 | mg Cl-L | 01/02/2008 | 10 | mg Cl-L | 01/02/2008 |
| Fluoreto | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg F-L | <0,1 | mg F-L | 01/02/2008 | 0,11 | mg F-L | 01/02/2008 |
| N-Nitrato | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO3/L | 0,11 | mg N-NO3/L | 01/02/2008 | 0,16 | mg N-NO3/L | 01/02/2008 |
| N-Nitrito | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO2/L | <0,1 | mg N-NO2/L | 01/02/2008 | <0,1 | mg N-NO2/L | 01/02/2008 |
| Sulfato | SMEWW 4110 B | 1 | mg SO4=L | 1,2 | mg SO4=L | 01/02/2008 | <1 | mg SO4=L | 01/02/2008 |

| | | |
|--|--------------------------|--------------------|
|  RELATÓRIO DE ENSAIOS | RE-5.0-12-00-A-0862/2008 | |
| | Rev. 00 | Data: 20/02/2008 |
| | Folha: 3 / 3 | Responsável: 629-0 |

| Laboratório Físico-químico | | | | | | | | | |
|----------------------------|------------------|-----------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|---------|-------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amo.: Lagoa 2 Amostra 05 | | | | | |
| | | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| | | | | Cód.: 0142/2008-ÁGUA - EX | | | | | |
| | | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | | | | |
| | | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | | | | |
| | | | | Matriz: Água | | | | | |
| Cianeto Livre | M Q3023 (8M4500- | 0,005 | mgCN/L | <0,005 | mgCN/L | 07/02/2008 | - | - | - |
| Condutividade | SMEWW 2510 B | 1 | µS/cm | 127 | µS/cm | 01/02/2008 | - | - | - |
| DQO-RF | SMEWW 5220-D | 5 | mg O ₂ /L | 118 | mg O ₂ /L | 01/02/2008 | - | - | - |
| Índice de Fenóis | SEWW 5630 C | 0,01 | mg de fenol/L | 0,025 | mg de fenol/L | 13/02/2008 | - | - | - |
| Análise de pH | SMEWW 4500 H + | - | - | 7,3 | pH | 01/02/2008 | - | - | - |
| Surfactantes | SMEWW 5540 C | 0,05 | mg MBA8/L | 0,21 | mg/L M | 01/02/2008 | - | - | - |
| CR. IÔNICA | | | | | | | | | |
| Cloreto | SMEWW 4110 B | 1 | mg Cl-L | 20 | mg Cl-L | 01/02/2008 | - | - | - |
| Fluoreto | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg F-L | 0,11 | mg F-L | 01/02/2008 | - | - | - |
| N-Nitrato | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO ₃ L | 0,18 | mg N-NO ₃ L | 01/02/2008 | - | - | - |
| N-Nitrato | SMEWW 4110 B | 0,1 | mg N-NO ₂ L | <0,1 | mg N-NO ₂ L | 01/02/2008 | - | - | - |
| Sulfato | SMEWW 4110 B | 1 | mg SO ₄ =L | 2 | mg SO ₄ =L | 01/02/2008 | - | - | - |

Obs.:

01. Ensaio de pH e condutividade realizados a 25°C.
02. DQO - Demanda Química de Oxigênio.

| Condições de Recebimento | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| Amostra | Recipiente | Preservação | Quantidade | Observação | Resp.Amostragem |
| 0138-ÁGUA - EX | Frasco de Polietileno | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |
| 0139-ÁGUA - EX | Frasco de Polietileno | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |

Raimundo Nouta Pereira
Químico - GELAB
C.R.Q. No. 7100136

Eduardo dos Santos Fontoura
Gerente - GELAB
C.R.Q. No. 7100427

* O(s) resultado(s) expresso(s) neste relatório referem-se apenas à(s) amostra(s) ensaiada(s).

* O Laboratório não se responsabiliza pela coleta da(s) amostra(s).

* Este relatório só deverá ser reproduzido na íntegra. O Laboratório não se responsabiliza pela reprodução parcial deste relatório.

Anexo 3 - Resultados das análises de metais pesados nas amostras de sedimentos e águas realizadas pela CETREL/Bahia,2008

| | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------------------|--|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0784/2008 | |
| | Rev: 00 | Data: | 15/02/2008 | |
| | Folha: 1 / 3 | Responsável: | 629-9 | |

| | |
|--|-----------------------|
| Cliente: MINISTÉRIO DA SAUDE Endereço: SCS Q.4 Bloco A Ed.Principal 2º Andar -Lote 67/97 Solicitante: Sr. Aramis Cardoso Referência: Conama 357 | CS: 5130 Proposta: |
|--|-----------------------|

| Laboratório de Ótica | | | | | | | | | |
|----------------------|---------------|-----------|-------|-----------------------------------|-------|-------------|----------------------------|-------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amc.: Amostra 01 Renato faz.Pajeu | | | Amc.: Amostra 02 Transição | | |
| | | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| SIO2 | IO-5.0.01-122 | - | - | 77 | % | 15/02/2008 | 66 | % | 15/02/2008 |
| METAIS ICP | | | | | | | | | |
| Alumínio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 4960 | mg/Kg | 12/02/2008 | 1996 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Boro Total | - | - | - | 44 | mg/Kg | 12/02/2008 | 17 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Bário Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | 56 | mg/Kg | 12/02/2008 | 22 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Berílio Total | - | - | - | <1 | mg/Kg | 12/02/2008 | <1 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Cálcio Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | 915 | mg/Kg | 12/02/2008 | 714 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Cádmio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Cobalto Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | 8,8 | mg/Kg | 12/02/2008 | <5 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Cromo Total | EPA 3051 | 10 | mg/Kg | 24 | mg/Kg | 12/02/2008 | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Cobre Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 9,4 | mg/Kg | 12/02/2008 | 2,9 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Ferro Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 13663 | mg/Kg | 12/02/2008 | 5710 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Potássio Total | - | - | - | 384 | mg/Kg | 12/02/2008 | 174 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Lítio Total | - | - | - | 3,2 | mg/Kg | 12/02/2008 | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Magnésio Total | - | - | - | 312 | mg/Kg | 12/02/2008 | 155 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Manganês Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | 293 | mg/Kg | 12/02/2008 | 78 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Molibdênio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Sódio Total | - | - | - | 38 | mg/Kg | 12/02/2008 | 16 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Níquel Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 3,1 | mg/Kg | 12/02/2008 | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Chumbo Total | EPA 3051 | 10 | mg/Kg | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Estanho Total | - | - | - | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Estrôncio Total | - | - | - | 4,4 | mg/Kg | 12/02/2008 | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Tálio Total | - | - | - | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Vanádio Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | 14 | mg/Kg | 12/02/2008 | 6,6 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| Zinco Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 21 | mg/Kg | 12/02/2008 | 9,7 | mg/Kg | 12/02/2008 |
| METAL GERADOR | | | | | | | | | |
| Arsênio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | 10 | mg/Kg | 15/02/2008 | 3,7 | mg/Kg | 15/02/2008 |
| Merúrio Total | EPA 7471 A | 0,1 | mg/Kg | <0,1 | mg/Kg | 15/02/2008 | <0,1 | mg/Kg | 15/02/2008 |
| Antimônio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 |
| Selênio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 |

| | | | | |
|---|-----------------------------|--|--------------------------|--------------------|
|  | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0784/2008 | |
| | | | Rev: 00 | Data: 15/02/2008 |
| | | | Folha: 2 / 3 | Responsável: 629-9 |

| Laboratório de Ótica | | | | | | | | | |
|----------------------|---------------|-----------|-------|-------------------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | | Amo.: Amostra 08 Final Balões | | | | | |
| | | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| SiO2 | IO-5.0.01-122 | - | - | 75 | % | 15/02/2008 | - | - | - |
| METAIS ICP | | | | | | | | | |
| Alumínio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 543 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Boro Total | - | - | - | <5 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Bário Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | 3,5 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Bérblio Total | - | - | - | <1 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Cálcio Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | 225 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Cádmio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Cobalto Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | <5 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Cromo Total | EPA 3051 | 10 | mg/Kg | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Cobre Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Ferro Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 1110 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Potássio Total | - | - | - | 49 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Lítio Total | - | - | - | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Magnésio Total | - | - | - | 39 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Manganés Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | 14 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Molibdénio Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Sódio Total | - | - | - | 8,8 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Níquel Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Chumbo Total | EPA 3051 | 10 | mg/Kg | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Estanho Total | - | - | - | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Estrôncio Total | - | - | - | <2 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Tálio Total | - | - | - | <10 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Vanádio Total | EPA 3051 | 5 | mg/Kg | <5 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| Zinco Total | EPA 3051 | 2 | mg/Kg | 4,4 | mg/Kg | 12/02/2008 | - | - | - |
| METAL GERADOR | | | | | | | | | |
| Arsénio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 | - | - | - |
| Mercurio Total | EPA 7471 A | 0,1 | mg/Kg | <0,1 | mg/Kg | 15/02/2008 | - | - | - |
| Antimónio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 | - | - | - |
| Selénio Total | EPA 3051 | 1 | mg/Kg | <1 | mg/Kg | 15/02/2008 | - | - | - |

| | | | | |
|--|-----------------------------|--------------|--------------------------|--|
|  PROTEÇÃO AMBIENTAL | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0784/2008 | |
| | Rev: 00 | Data: | 15/02/2008 | |
| | Folha: 3 / 3 | Responsável: | 629-9 | |

Laboratório de Ótica

Obs.:

01. Resultados em base seca.

Condições de Recebimento

| Amostra | Recipiente | Preservação | Quantidade | Observação | Resp. Amostragem |
|------------------|---------------|-------------|------------|------------|------------------|
| 0148-SEDIMENTO - | Saco Plástico | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |
| 0153-SEDIMENTO - | Saco Plástico | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |
| 0154-SEDIMENTO - | Saco Plástico | Refrigerada | 1 | | Pedro Lima |

 Raimundo Nouta Pereira
 Químico - GELAB
 C.R.Q. No. 7100136

 Eduardo dos Santos Fontoura
 Gerente - GELAB
 C.R.Q. No. 7100427

* O(s) resultado(s) expresso(s) neste relatório referem-se apenas a(s) amostra(s) encalada(s).

* O Laboratório não se responsabiliza pela coleta da(s) amostra(s).

* Este relatório só deverá ser reproduzido na íntegra. O Laboratório não se responsabiliza pela reprodução parcial deste relatório.

| | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------------------|--|
|  Proteção Ambiental | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0783/2008 | |
| | Rev: 01 | Data: | 15/02/2008 | |
| | Folha: 1 / 4 | Responsável: | 629-9 | |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Ciente: MINISTÉRIO DA SAÚDE Endereço: Scs Q.4 Bloco A Ed.Principal 2º Andar -Lote 67/97 Solicitante: Sr. Aramis Cardoso Referência: Conama 357 | CS: 5130 Proposta: |
|---|-------------------------------------|

Laboratório de Ótica

| Ensaio | Método | LDM/Unid. | Amss...: Renato Faz. Pajeu Amostra 01 Cód...: 0138/2008-ÁGUA - EX Data da Coleta: 31/01/2008 Data de Entrega: 01/02/2008 Matriz: Água | | | Ams.: Transição Amostra 02 Cód.: 0139/2008-ÁGUA - EX Data da Coleta: 31/01/2008 Data de Entrega: 01/02/2008 Matriz: Água | | |
|----------------------|--------------|------------|---|------------|------------------|--|------------|-------------|
| | | | Result.. | Unid.. | DtDt.Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise |
| METAIS ICP | | | | | | | | |
| Alumínio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal0,16 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 5,9 mg/L | 08/02/2008 | |
| Boro Total | SMEWW 3120 B | 0,03 mg/L | <0,03QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,03 mg/L | 08/02/2008 | |
| Bário Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal0,01 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 0,02 mg/L | 08/02/2008 | |
| Berílio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,005 mg/L | 08/02/2008 | |
| Cálcio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal2,4 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 2,9 mg/L | 08/02/2008 | |
| Cádmio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,005 mg/L | 08/02/2008 | |
| Cobalto Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Cromo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Cobre Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,005 mg/L | 08/02/2008 | |
| Ferro Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal0,35 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 0,39 mg/L | 08/02/2008 | |
| Potássio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal1,7 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 1,6 mg/L | 08/02/2008 | |
| Lítio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Magnésio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal1,1 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 1,4 mg/L | 08/02/2008 | |
| Manganês Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal0,02 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 0,03 mg/L | 08/02/2008 | |
| Molibdênio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,05 mg/L | 08/02/2008 | |
| Sódio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal5,2 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 3 mg/L | 08/02/2008 | |
| Níquel Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Chumbo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Silício Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | QLbVal6 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 4,6 mg/L | 08/02/2008 | |
| Estanho Total | SMEWW 3120 B | 0,1 mg/L | QLbVal<0,1 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,1 mg/L | 08/02/2008 | |
| Estrôncio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | QLbVal0,02 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | 0,02 mg/L | 08/02/2008 | |
| Tálio Total | SMEWW 3120 B | 0,4 mg/L | QLbVal<0,4 | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,4 mg/L | 08/02/2008 | |
| Vanádio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,05 mg/L | 08/02/2008 | |
| Zinco Total | SMEWW 3120 B | 0,02 mg/L | <0,02QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,02 mg/L | 08/02/2008 | |
| METAL GERADOR | | | | | | | | |
| Arsênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |
| Mercúrio Total | SMEWW 3112 B | 0,001 mg/L | <0,001QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,001 mg/L | 08/02/2008 | |
| Antimônio Total | SMEWW 3114 B | 0,005 mg/L | <0,005QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,005 mg/L | 08/02/2008 | |
| Selênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01QLbVal | QLbUnimg/L | 08/02/2008QLbDat | <0,01 mg/L | 08/02/2008 | |

| | | | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------------------|--|
|  Proteção Ambiental | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0783/2008 | |
| | Rev: 01 | Data: | 15/02/2008 | |
| | Folha: 2 / 4 | Responsável: | 629-9 | |

| Laboratório de Ótica | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------|------------|-------------------------------|-------|-------------|-----------------------------|-------|-------------|--|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | Amc.: Final Balões Amostra 03 | | | Amc.: Lagoa 01 Amostra 04 | | | |
| | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise | |
| | | | Cod.: 0140/2008-ÁGUA - EX | | | Cod.: 0141/2008-ÁGUA - EX | | | |
| | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | | Data da Coleta: 31/01/2008 | | | |
| | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | | Data de Entrega: 01/02/2008 | | | |
| | | | Matriz: Água | | | Matriz: Água | | | |
| METAIS ICP | | | | | | | | | |
| Alumínio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,19 | mg/L | 08/02/2008 | 0,16 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Boro Total | SMEWW 3120 B | 0,03 mg/L | <0,03 | mg/L | 08/02/2008 | 0,06 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Bário Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,01 | mg/L | 08/02/2008 | 0,02 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Berílio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Cálcio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 4 | mg/L | 08/02/2008 | 1,7 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Cádmio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Cobalto Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Cromo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Cobre Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Ferro Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,3 | mg/L | 08/02/2008 | 1,1 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Potássio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 1,6 | mg/L | 08/02/2008 | 5,8 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Lítio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Magnésio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 1,6 | mg/L | 08/02/2008 | 2,8 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Manganês Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,06 | mg/L | 08/02/2008 | 0,04 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Molibdênio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Sódio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 3 | mg/L | 08/02/2008 | 7,8 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Níquel Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Chumbo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Silício Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | 4,6 | mg/L | 08/02/2008 | 2,5 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Estanho Total | SMEWW 3120 B | 0,1 mg/L | <0,1 | mg/L | 08/02/2008 | <0,1 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Estrôncio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,03 | mg/L | 08/02/2008 | 0,02 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Tálio Total | SMEWW 3120 B | 0,4 mg/L | <0,4 | mg/L | 08/02/2008 | <0,4 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Vanádio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Zinco Total | SMEWW 3120 B | 0,02 mg/L | <0,02 | mg/L | 08/02/2008 | <0,02 | mg/L | 08/02/2008 | |
| METAL GERADOR | | | | | | | | | |
| Arsênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Mercúrio Total | SMEWW 3112 B | 0,001 mg/L | <0,001 | mg/L | 08/02/2008 | <0,001 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Antimônio Total | SMEWW 3114 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | |
| Selênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | |

| | | | | |
|---|-----------------------------|--|--------------------------|------------|
|  PROTEÇÃO AMBIENTAL | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0783/2008 | |
| | Rev: 01 | | Data: | 15/02/2008 |
| | Folha: 3 / 4 | | Responsável: | 629-9 |

| Laboratório de Ótica | | | | | | | | | |
|--|--------------|------------|--------------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|---|
| Ensaio | Método | LDM/Unid. | Amo.: Lagoa 2 Amostra 06 | | | | | | |
| | | | Result. | Unid. | Dt. Análise | Result. | Unid. | Dt. Análise | |
| Cód.: 0142/2008-ÁGUA - EX Data da Coleta: 31/01/2008 Data de Entrega: 01/02/2008 Matriz: Água | | | | | | | | | |
| METAIS ICP | | | | | | | | | |
| Alumínio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,69 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Boro Total | SMEWW 3120 B | 0,03 mg/L | 0,07 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Bário Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,02 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Berílio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Cálcio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 1,8 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Cádmio Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Cobalto Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Cromo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Cobre Total | SMEWW 3120 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Ferro Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 2,5 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Potássio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 8 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Lítio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Magnésio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 2,2 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Manganês Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,09 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Molibdênio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Sódio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 13 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Níquel Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Chumbo Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Silício Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | 6,2 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Estanho Total | SMEWW 3120 B | 0,1 mg/L | <0,1 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Estrôncio Total | SMEWW 3120 B | 0,01 mg/L | 0,02 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Tálio Total | SMEWW 3120 B | 0,4 mg/L | <0,4 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Vanádio Total | SMEWW 3120 B | 0,05 mg/L | <0,05 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Zinco Total | SMEWW 3120 B | 0,02 mg/L | <0,02 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| METAL GERADOR | | | | | | | | | |
| Arsênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Mercurio Total | SMEWW 3112 B | 0,001 mg/L | <0,001 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Antimônio Total | SMEWW 3114 B | 0,005 mg/L | <0,005 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |
| Selênio Total | SMEWW 3114 B | 0,01 mg/L | <0,01 | mg/L | 08/02/2008 | - | - | - | - |

| | | | | |
|--|-----------------------------|--------------------|--------------------------|------------------|
|  PROTEÇÃO AMBIENTAL | RELATÓRIO DE ENSAIOS | | RE-5.0-12-00-A-0783/2008 | |
| | | | Rev: 01 | Data: 15/02/2008 |
| | Folha: 4 / 4 | Responsável: 629-9 | | |

Laboratório de Ótica

Obs.:

01. Rev-01: Revisão gerada para inclusão do resultado de chumbo.
 02. O relatório de ensaio (5.0-12-00-A-0783/2008 rev-01) substitui o relatório de ensaio 5.0-12-00-A-00783/2008, rev-00/08 datado em 15/02/08.

Condições de Recebimento

| Amostra | Recipiente | Preservação | Quantidade | Observação | Resp.Amostragem |
|----------------|-----------------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 0138-AGUA - EX | Frasco de Polietileno | Refrigerada | 500mL | | Pedro Lima |
| 0139-AGUA - EX | Frasco de Polietileno | Refrigerada | 500mL | | Pedro Lima |

 Raimundo Nouta Pereira
 Químico - GELAB
 C.R.Q. No. 7100136

 Eduardo dos Santos Fontoura
 Gerente - GELAB
 C.R.Q. No. 7100427

* O(s) resultado(s) expresso(s) neste relatório referem-se apenas à(s) amostra(s) encalada(s).

* O Laboratório não se responsabiliza pela coleta da(s) amostra(s).

* Este relatório só deverá ser reproduzido na íntegra. O Laboratório não se responsabiliza pela reprodução parcial deste relatório.

Anexo 4 – Resultados das amostras coletadas para pesquisa de toxina botulínica, esporos de *Clostridium botulinum* e soroneutralização realizadas pela Unep



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

“CÂMPUS” DE ARAÇATUBA - CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais

Rua Clóvis Pestana, 793 - Bloco-37

Araçatuba, 16050 680 SP.

Entrada do Material: 28/02/08 – quinta-feira – 17:10 horas

RG.: 3354

CENTREL S. A. Empresa de Proteção Ambiental

Via Atlântica, Km 9 – Polo Petroquímico – Camaçari – BA – CEP: 42810 – 000

Tel.: (55) 71 3634 6880 – Fax.: (55) 71 3632 2583

Escritório Salvador – Av. Tancredo Neves, 3343 – Ed. Cempre, Torre A, 14^o andar

CEP: 41820 – 021 – Salvador – BA

Tel.: (55) 71 3273 2200 Fax.: (55) 71 3273 2212

Material enviado por: Dr. Pedro Cerqueira Lima

Exame solicitado: Pesquisa de toxina botulínica, esporos de *Clostridium botulinum* e soroneutralização

Material enviado

| Patos | Sedimentos |
|---|--|
| <p>N.1 <i>Denseicygna autumnalis</i>, N.2 <i>Amazoneta brasiliensis</i>, N.3 <i>Dendrocygna viduata</i>, N.4 <i>Amazoneta brasiliensis</i>, N.5 <i>Dendrocygna viduata</i>, N.6 <i>Dendrocygna viduata</i>, N.7A <i>Dendrocygna autumnalis</i>, N.7B <i>Dendrocygna autumnalis</i>, N.10 Carcaça (<i>Vanelus Chilensis</i>) Lagoa Renato, Serrote Pelado. N.11 Carcaça 22/02/2008 <i>Aramus guaraúna</i>.</p> | <p>N.1 Sedimento Reator N.2 Sedimento transição ½ N.3 Sedimento Balões</p> |
| Moluscos | Algas |
| <p>N.1 Moluscos reator N.2 Moluscos transição ½ N.3 Moluscos Balões N.9 Caramujos</p> | <p>N.1 Algas reator N. 2 Algas Transição ½ N.3 Algas Balões N.8 Algas (22/02/08) Lagoa Renato – Serrote Pelado N.12 Algas (22/02/08) lagoa Renato – Serrote Pelado</p> |

RESULTADOS

Resultado da pesquisa direta de toxina botulínica pelo teste de bioensaio (segundo técnica do CDC), e neutralização em camundongo, dos materiais biológicos das diferentes espécies de patos envolvidos na mortalidade

| Patos | | Toxina | Moela | C. intestinal | Fígado |
|-------|-------------------------------|--------|-------|------------------|--------|
| 1 | <i>Denseicygna autumnalis</i> | | - | - | ■* |
| 2 | <i>Amazoneta brasiliensis</i> | Tipo C | + | + | + |
| 3 | <i>Dendrocygna viduata</i> | | ■ | ■ | ■ |
| 4 | <i>Amazoneta brasiliensis</i> | TipoC | - | + | + |
| 5 | <i>Dendrocygna viduata</i> | | - | - | - |
| 6 | <i>Dendrocygna viduata</i> | | - | - | - |
| 7A | <i>Dendrocygna autumnalis</i> | | ■ | ■ | - |
| 7B | <i>Dendrocygna autumnalis</i> | TipoC | - | + | + |

Fonte: Iveraldo dos Santos Dutra.

*Os materiais marcados em vermelho continham toxina botulínica para provocar sintomas nos camundongos, mas os mesmo não morreram. Pela técnica eles são tidos como negativos, mesmo embora tenham sido neutralizados pela antitoxina C.

Presença de esporos de Clostridium botulinum nas amostras de Sedimento, verificada pela inoculação dos materiais em meio de cultura CMM, bioensaio em camundongo e soroneutralização

| Sedimento: | Pesquisa Indireta | Toxina: |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| 1- Sedimento reator | + | Tipo D |
| 2- Sedimento transição 1/2 | + | Não tipificado |
| 3 – Sedimento Balões | + | Tipo C e Tipo D |

Moluscos e algas foram negativos para a presença de esporos ou de toxina botulínica.

Araçatuba, 01 de Abril de 2008

Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

CRMV-SP 4699

Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais

Unesp-Câmpus de Araçatuba

Telefax.: 18-36228451

E-mail: isdutra@fmva.unesp.br