

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

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

**Relatório final  
(2016-2017)**

**Resistência bacteriana em Procellariiformes: riscos para a  
conservação de aves oceânicas ameaçadas ou  
coevolução?**

**Daniela Alves Cardoso**

**Orientadora: Patricia Pereira Serafini**

**Florianópolis  
Agosto/2017**

## 1. Resumo

Albatrozes e Petréis estão entre as aves marinhas mais ameaçadas de extinção e raramente se aproximam do ambiente terrestre, exceto para reprodução. Possuem grande capacidade de deslocamento e a maior diversidade no hemisfério sul. Apenas duas espécies nidificam em território brasileiro, as demais são aves migratórias. A mortalidade pela captura incidental na pesca industrial é uma das maiores ameaças. O principal objetivo deste estudo foi identificar a microbiota cloacal e de orofaringe destas aves, realizando testes bioquímicos e microbiológicos, além da determinação da resistência a antibióticos, relacionando esta última com o uso de antibióticos utilizados no Distrito de Fernando de Noronha. Foram realizadas coletas em parceria com o Projeto de Monitoramento de Praias em Santa Catarina e o material das áreas de nidificação foi obtido em expedição ao arquipélago de Fernando de Noronha. Foram coletadas 82 amostras cloacais e orais de *Puffinus lherminieri*, *Puffinus puffinus*, *Puffinus griseus*, *Puffinus gravis*, *Thalassarche melanophris*, *Macronectes giganteus*, *Procellaria aequinoctialis*, *Procellaria conspicillata*, *Oceanites oceanicus*, *Pachyptila desolata* e *Calonectris diomedea*. No processamento das 82 amostras foram isoladas 82 colônias que culminaram com a identificação de 11 bactérias: *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Serratia* sp, *Estafilococcus* sp, e *Enterobacter* sp. Padrões de resistência bacteriana também foram estabelecidos. A microbiologia é ferramenta para o monitoramento populacional e da qualidade ambiental.

Palavras-chave: *Resistência antibiótica, Microbiota, Procellariiformes.*

## 2. Abstract

Albatrosses and Petrels are among the most endangered seabirds and rarely approach the terrestrial environment except for breeding. They have great flight capacity and the higher diversity in the southern hemisphere. Only two species nest in Brazilian territory, the others are migratory birds. Mortality from bycatch in industrial fisheries is one of the greatest threats. The main objective of this study was to identify the cloacal and oral microbiota of these birds, performing biochemical and microbiological tests, as well as to assess bacterial antibiotic resistance, relating the latter to the use of antibiotics used in the District of Fernando de Noronha. Sampling was carried out in partnership with the Beach Monitoring Project in Santa Catarina and material from the nesting areas was obtained by expedition to the Fernando de Noronha archipelago. A total of 82 cloacal and oral samples of *Puffinus lherminieri*, *Puffinus puffinus*, *Puffinus griseus*, *Puffinus gravis*, *Thalassarche melanophris*, *Macronectes giganteus*, *Procellaria aequinoctialis*, *Procellaria conspicillata*, *Oceanites oceanicus*, *Pachyptila desolata* and *Calonectris diomedea* were collected. For the 82 samples, 82 colonies were isolated, culminating in the identification of 11 bacteria: *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Serratia* sp, *Staphylococcus* sp and, *Enterobacter* sp. Bacterial resistance patterns have also been established. Microbiology is a tool for population and environmental quality monitoring.

*Key words: Antibiotic resistance, Microbiota, Procellariiformes.*

### 3. Lista de Figuras e tabelas

<b>Figura 1-</b> Diversidade de bactérias identificadas e suas frequências em Procellariiformes.....	13
<b>Tabela 1-</b> Espécies de Procellariiformes analisadas e bactérias identificadas das amostras coletadas no período de 26/04 a 28/09/2016 no Litoral de Santa Catarina e amostras coletadas no período de 07 a 11 de novembro de 2016 durante expedição ao arquipélago de Fernando de Noronha.....	14
<b>Figura 2-</b> Frequência de bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos.....	15
<b>Figura 3-</b> Frequência de bactérias gram-positivas resistentes a antibióticos.....	16

#### **4. Lista de abreviaturas**

**ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**

**BHI - *Brain Heart Infusion***

**CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres**

**CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute**

**EPM – Ágar inclinado verde para realização de provas de LTD, glicose, gás e H<sub>2</sub>S**

**ESEC – Estação Ecológica**

**GI- Grau de Liberdade**

**LTD – L-Triptofano**

**MC- Meio de cultura MacConkey**

**MIO – Motilidade, Indol e Ornitina**

**PIBIC – Programa de Iniciação Científica**

**PLANACAP - Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis**

**PMP-BS - Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos**

**PR- Paraná**

**SP- São Paulo**

**TSI – *Triple Sugar Iron***

**UFC- Unidade Formadora de Colônias**

**UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina**

**$\chi^2$ - Símbolo do teste estatístico de Qui quadrado**

## 5. Sumário

1. Resumo .....	1
2. Abstract.....	2
3. Lista de Figuras.....	3
4. Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	4
5. Sumário.....	5
6. Introdução.....	6
7. Objetivos.....	9
8. Material e Métodos.....	10
9. Resultados.....	13
10. Discussão.....	17
11. Recomendações para o manejo.....	19
12. Agradecimentos.....	20
13. Citações e referências bibliográficas.....	21

## 6. Introdução

O Brasil abriga uma imensa diversidade biológica, cerca de 15 a 20% de toda as espécies descritas no planeta (LEWINSOHN & PRADO, 2005). A costa do litoral brasileiro é banhada pelo Oceano Atlântico, com 8.500 quilômetros de extensão, mais de 100 espécies de aves estão associadas a este bioma costeiro e marinho, sendo algumas residentes e outras migrantes (PIACENTINI *et al.*, 2015). Assim, percebe-se a importância da conservação dessas espécies em nível mundial (BRASIL, 2016).

As aves marinhas evoluíram há cerca de 40 a 50 milhões de anos no final do período Eoceno (MARIANI, 2016). A ordem Procellariiformes inclui os albatrozes e petréis, aves oceânicas que utilizam o ambiente terrestre (insular) apenas para nidificar, ou seja, passam a maior parte de suas vidas em alto mar (ONLEY & SCOFIELD, 2007). São aves que se alimentam exclusivamente de presas marinhas e não migram em áreas continentais. Possuem características anatômicas adaptadas para percorrerem longas distâncias e sobreviverem em alto mar (NEVES *et al.*, 2006).

Os Procellariiformes estão entre as aves mais ameaçadas de extinção em todo o mundo e são especialmente vulneráveis à mortalidade associada com a pesca de espinhel (NEVES *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.* 2016). Outros fatores vêm aumentando o risco de mortalidade desses animais (PHILLIPS *et al.* 2016). Por exemplo, espécies exóticas invasoras colaboram para a destruição de ninhos e a introdução de patógenos, alterando as taxas naturais de sobrevivência e de reprodução (PHILLIPS *et al.* 2016). No Brasil duas espécies de petréis se reproduzem em território nacional, a Pardela-de-asa-larga (*Puffinus lherminieri*) no Arquipélago de Fernando de Noronha e a Pardela-de-trindade (*Pterodroma arminjoniana*) no Arquipélago de Trindade e Martin Vaz. Os grandes albatrozes não se reproduzem em território brasileiro (ONLEY & SCOFIELD, 2007). São aves migratórias que, apesar de se reproduzirem em ilhas subantárticas, passam a maior parte de seu ciclo de vida no Atlântico sul, incluindo águas jurisdicionais do Brasil (SERAFINI, 2016).

No Brasil pouco se sabe sobre a microbiota natural dessas aves, tendo em vista a dificuldade de acesso, captura e coleta de amostras dos animais saudáveis em ambiente natural (SERAFINI, 2016). Em tese, a maioria das espécies da ordem dos Procellariiformes não teria contato com novos patógenos em suas colônias, já que se reproduzem em ilhas oceânicas bastante isoladas. Porém, doenças potencialmente originadas em aves de produção já se mostraram alarmantes para Procellariiformes em algumas colônias como é o caso da

cólera aviária que causa mortalidade e baixas taxas reprodutivas para a espécie *Diomedea amsterdamensis* (albatroz-de-Amsterdã), oriundo da Ilha de Amsterdã (WEIMERSHIRCH, 2004)

Sabe-se que a ação do homem interfere sobre toda a diversidade do planeta. Entre os microrganismos, as bactérias possuem o maior número de espécies patogênicas para os seres humanos (WINN *et al.* 2012). Nos últimos anos vem aumentando as investigações sobre as ações antrópicas que possam estar influenciando a introdução de novos patógenos no meio ambiente e interferindo na microbiota de animais selvagens. Contaminação por material biológico de hospitais oriundos de descartes inadequados e uso indevido de antibióticos são exemplos que podem estar afetando a microbiota das espécies de animais que supostamente nunca tiveram contato com antimicrobianos, tornando bactérias multirresistentes (SOUSA, M. *et al.* 2014) O impacto dessas ações nas populações de aves exclusivamente oceânicas talvez seja mais complexo para identificar já que passam pouco tempo em ambiente terrestre, utilizam ambientes insulares em regiões isoladas e submetidas a baixas temperaturas, com interferência humana relativamente reduzida (WEIMERSHIRCH, 2004).

A resistência aos antibióticos por parte de bactérias presentes em animais selvagens, representam uma preocupação emergente de saúde pública e para a conservação da biodiversidade (SOUSA, M. *et al.* 2014). As bactérias têm vários mecanismos de defesa, esses estão ligados às alterações que são capazes de fazer nas suas estruturas bioquímicas, como as modificações na permeabilidade da membrana, a síntese de enzimas capazes de inativar os antibióticos, mudanças dos sítios de ação dos mesmos, impedindo seus efeitos inibidores (FREITAS, 1989).

O Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis (PLANACAP) é a ferramenta nacional para abordar de forma coletiva todas as ameaças que afetam estas aves ameaçadas e estabelece o planejamento para a implementação de atividades que busquem a conservação dessas espécies em longo prazo. A cada cinco anos o Plano é revisado, ocorrendo a monitoria anual das ações executadas e avaliação da efetividade dos resultados alcançados através de indicadores. Dentre as atividades a serem desenvolvidas no PLANACAP está o compromisso de promover pesquisas sobre a biologia e sobre a saúde de albatrozes e petréis no Brasil, visando à sua conservação (BRASILIA, 2013).

Avaliar a microbiota dos Procellariiformes se faz necessário, bem como testar a resistência das colônias de bactérias encontradas frente aos antibióticos. Esses estudos podem embasar o maior controle de bactérias zoonóticas e orientar o manejo do descarte decorrente de atividades humanas nos oceanos, uma vez que trarão subsídios para a melhor compreensão de sua transmissibilidade, evitando assim possíveis mortalidades em massa de aves marinhas ameaçadas por patógenos desconhecidos.

## **7. Objetivos**

### **Objetivo geral:**

Identificar a microbiota cloacal e de orofaringe em Procellariiformes encontrados doentes ou mortos no monitoramento da costa do litoral catarinense e no arquipélago de Fernando de Noronha, testando a resistência a antibióticos.

### **Objetivos específicos:**

Determinar os padrões bacteriológicos e de resistência bacteriana a antibióticos em todas as aves marinhas da Ordem Procellariiformes amostradas no litoral de Santa Catarina durante os meses de estudo.

Identificar as bactérias presentes nas aves e avaliar a resistência bacteriana das amostras dos Procellariiformes capturados no arquipélago de Fernando de Noronha e relacionar com o uso de antimicrobianos utilizados pelos pacientes atendidos pelo hospital da ilha principal.

Subsidiar a implementação de ações do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis - PLANACAP.

## 8. Material e Métodos

Amostras foram coletadas no período de 26/04/2016 a 23/05 de 2017 durante o monitoramento nas praias da região de Florianópolis pela equipe do *Projeto de Monitoramento de Praias - Bacia de Santos (PMP-BS)* coordenado pela UNIVALI e executado por parceiros (R3 Animal) como exigência do licenciamento ambiental da atividade de extração de petróleo e gás pela empresa Petrobrás. O trabalho conta também com amostras coletadas de pardelas-de-asa-larga (*Puffinus lherminieri*) durante expedição ao arquipélago de Fernando de Noronha realizada no período de 07 a 11 de novembro de 2016. Todas as 68 amostras coletadas pelo PMP-BS e cedidas para a realização desta pesquisa eram de *Puffinus puffinus*, *Puffinus gravis*, *Calonectris diomedea*, *Puffinus griseus*, *Thalassarche melanophris*, *Macronectes giganteus*, *Procellaria aequinoctialis*, *Procellaria conspicillata*, *Oceanites oceanicus* e *Pachyptila desolata*. Estes animais foram encontrados debilitados ou mortos (carcaças encalhadas nas praias, sem estágio de decomposição avançado). Já as amostras coletadas das aves de Fernando de Noronha eram de indivíduos sadios nidificando. As amostras da orofaringe e da cloaca foram coletadas com o uso de suabes estéreis e armazenadas em meio de transporte Stuart (BRASIL, 2004), sendo processadas posteriormente no laboratório de qualidade de água e microbiologia do ICMBio localizado na ESEC-Carijós em Florianópolis- SC.

No laboratório as amostras foram manipuladas em ambiente estéril durante todos os processos (fluxo laminar). Primeiramente eram passadas para o meio de enriquecimento BHI (*Brain Heart Infusion* - New Prov-Pinhais/PR, BRASIL, 2004). Posteriormente eram deixadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Havendo crescimento bacteriano, indicado pela turbidez do meio, a amostra foi acondicionada em microtubos estéreis contendo 30% de glicerina. As amostras foram agitadas em agitador tipo vortex e congeladas em duplicata a - 20°C garantindo a preservação do material biológico para futuro processamento (MEURER, 2015). Após descongelamento, as amostras foram semeadas nos meios Ágar Sangue (ASA) e MacConkey (MC), sendo que este último inibe o crescimento de bactérias gram positivas.

Depois das amostras serem semeadas em estrias no meio ASA e MC em placas de Petri. As placas foram levadas a estufa onde permaneceram 24 horas a 37°C. Após este período de incubação, foi feita a caracterização morfológica das colônias. As mesmas foram submetidas à coloração de gram e, a partir desse resultado, realizou-se o teste da catalase para bactérias gram positivas, no qual adiciona-se gotas de peróxido de hidrogênio sobre alíquota da colônia pura. Caso o resultado do teste da catalase fosse positivo, executava-se o teste de

aglutinação para identificação de *Staphylococcus aureus*. Para as bactérias confirmadas gram negativas em meio MC, realizou-se teste de oxidase em fita (New Prov, Pinhais, PR).

As colônias puras foram inoculadas em meio TSI que ajuda na investigação de bactérias que fermentam carboidratos (dextrose, lactose e sacarose) e na produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), os resultados alcançados depois dos tubos serem incubados a 37°C durante 24 horas em estufa foram interpretados segundo a padronização da ANVISA (BRASIL, 2004).

Uma colônia pura também foi replicada no conjunto de provas bioquímicas do *Enterokit B* (Probac do Brasil, São Paulo, SP). O *Enterokit B* é composto por três meios diferentes: Citrato, EPM e MILI. Estes meios totalizam oito testes que incluído ao da fermentação da lactose permitem a identificação de enterobactérias. Os testes do *Enterokit B* também foram incubados a 37 °C durante 24 horas em estufa. Os resultados obtidos no conjunto de testes do *Enterokit B* foram analisados seguindo as orientações do fabricante. Unindo e interpretando todos os resultados alcançados, buscou-se na literatura e na metodologia padronizada a identificação dos gêneros e espécies das bactérias isoladas (WINN *et al.* 2012).

Para realizar o teste de resistência a antibióticos usou-se a técnica de disco-difusão. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), esse teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é um dos métodos mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. Para realizar o teste inoculou-se uma colônia pura em solução salina (0,85%). Utiliza-se a escala padrão Mac Farland (1x10<sup>6</sup> UFC/ml) para avaliar a turbidez. Posteriormente espalhou-se a mistura com o auxílio de um cotonete estéril em uma placa petri contendo meio Muller Hinton. Na superfície do meio inoculado, colocaram-se discos de papel impregnados com diferentes concentrações de diferentes tipos de antibióticos. Para determinar quais os discos de antibióticos utilizados no teste seguiu-se as indicações do fabricante. Para as bactérias gram negativas os antibióticos foram: cefalexina(30µg), ampicilina (10µg), amicacina (30µg), amoxicilina(30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg). E para as bactérias gram positivas: gentamicina (10µg), penicilina G (10µg), azitromicina (15µg), sulfonamidas (300µg ), ciprofloxacina (5µg) , e enrofloxacina (5µg). Após 24 horas em estufa a temperatura de 37°C. Mediu-se o tamanho dos halos, expresso em milímetros, o resultado foi traduzido em susceptível (S), intermediário (I) ou resistente (R) de acordo com as especificações do CLSI (BRASIL, 2005).

Foi utilizado o teste Qui-quadrado com correção contínua de Yates, para comparar a proporção de gram positivas com gram negativas. O qui-quadrado também foi utilizado para testar a hipótese de que Gram - negativas e positivas se diferem quanto ao número de antibióticos aos quais apresentam resistência. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa RStudio.

## 9. Resultados

Foram analisadas 82 amostras, dessas foram isoladas 82 colônias sendo 24 gram-positivas e 58 gram-negativas. Esta proporção demonstra que há diferença significativa neste padrão, sendo bactérias gram-positivas mais frequentes nas amostras de Procellariiformes amostrados até o momento ( $\chi^2=14.098$ ,  $df = 1$ ,  $p\text{-value} = 0.0001736$ ). Dentre as colônias, seis espécies de bactérias foram identificadas: *Citrobacter freundii* (18,86%), *Escherichia coli* (13,12 %), *Citrobacter diversus* (3,28 %), *Klebsiella pneumoniae* (1,64%), *Proteus mirabilis* (1,64%%), *Serratia marcescens* (0,82%), além de outros quatro gêneros, que apesar de isolados, não permitiram identificação em nível específico: *Estafilococos* sp (13,12%), *Serratia* sp (6,56%), *Streptococcus* sp (4,10%), *Bacillus* sp (2,46%), , *Enterobacter* sp (1,64%) (tabela1). Das 82 amostras quatro amostras (3,28 %) obtiveram crescimento de colônias que foram inconclusivas nos testes bioquímicos realizados (figura 1).

Em três amostras não houve crescimento de colônias bacterianas quando semeadas nos meios ASA e MC. Para as bactérias de maior importância para a saúde das populações das aves ou para aquelas em que as provas bioquímicas não permitiram identificação, em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina, será realizado o sequenciamento genético para confirmar a identificação dos microorganismos, bem como possibilitar análises de filogenia. Ao todo serão sequenciadas, nos próximos meses, 21 amostras.

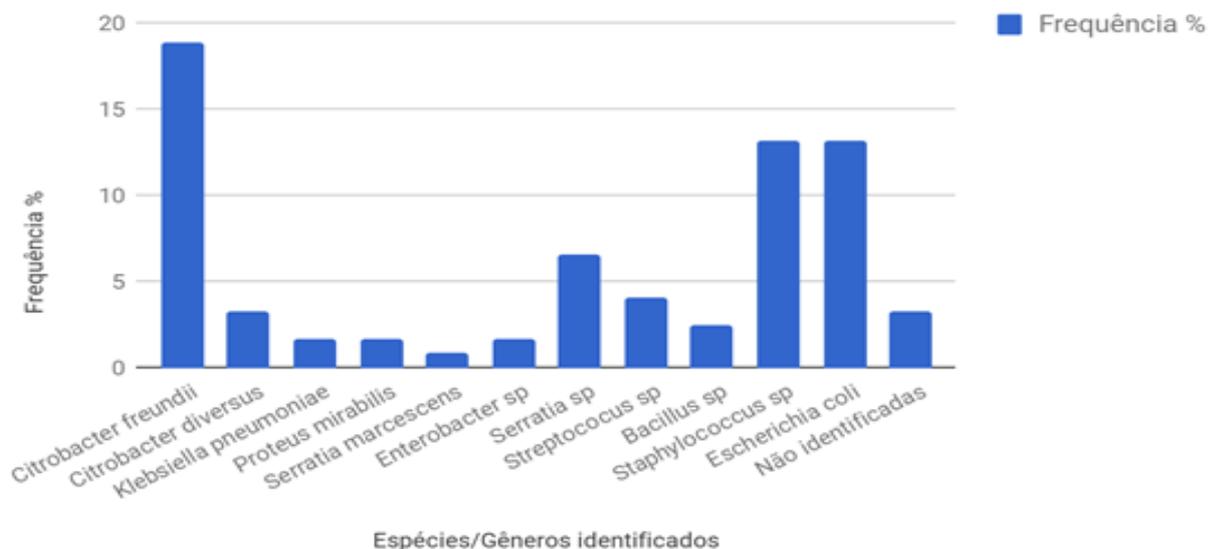


Figura 1- Diversidade de bactérias identificadas e suas frequências em Procellariiformes.

Tabela 1- Espécies de Procellariiformes analisadas e bactérias identificadas das amostras coletadas no período de 26/04 a 23/05/2017 no Litoral de Santa Catarina e amostras coletadas no período de 07 a 11 de novembro de 2016 durante expedição ao arquipélago de Fernando de Noronha.

<b>Espécies de Procellariiformes</b>	<b>Espécies de bactérias identificadas</b>
<i>Puffinus puffinus</i>	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Estafilococos</i> sp, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Streptococcus</i> sp , <i>Serratia</i> sp, <i>Bacillus</i> sp e <i>Enterobacter</i> sp
<i>Puffinus griseus</i>	<i>Streptococcus</i> sp , <i>Citrobacter diversus</i> e <i>Bacillus</i> sp
<i>Puffinus lherminieri</i>	<i>Streptococcus</i> sp
<i>Thalassarche melanophris</i>	<i>Serratia</i> sp, <i>Estafilococos</i> sp, <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter diversus</i> e <i>Escherichia coli</i>
<i>Macronectes giganteus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Procellaria aequinoctialis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i> sp, <i>Serratia</i> sp , <i>Estafilococos</i> sp e <i>Citrobacter freundii</i>
<i>Calonectris diomedea</i>	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter diversus</i> e <i>Escherichia coli</i>
<i>Procellaria conspicillata</i>	<i>Serratia</i> sp e <i>Citrobacter freundii</i>
<i>Puffinus gravis</i>	<i>Serratia</i> sp
<i>Oceanites oceanicus</i>	<i>Streptococcus</i> sp e <i>Escherichia coli</i>
<i>Pachyptila desolata</i>	<i>Estafilococos</i> sp e <i>Escherichia coli</i>

Das bactérias gram-negativas isoladas, foi possível identificar que maior número de colônias apresentaram de forma significativa resistência aos antibióticos ampicilina, cefalexina e amoxicilina ( $\chi^2= 633.21$ ,  $df = 20$ ,  $p\text{-value} < 2.2e-16$ ). O gráfico abaixo evidencia o exposto (Figura 2).

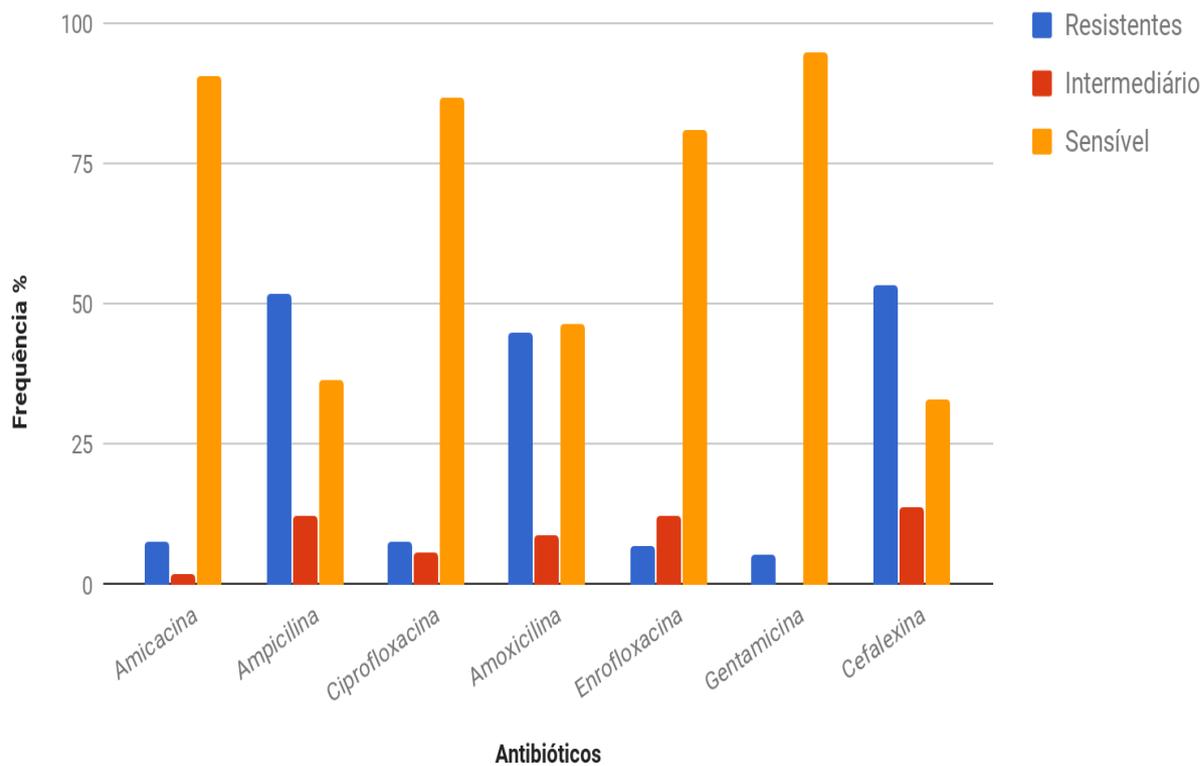


Figura 2 - Frequência de bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos.

Para bactérias gram positivas, a frequência de resistência bacteriana foi aleatória, ou seja, não houveram padrões observados para antibióticos específicos (Figura 3).

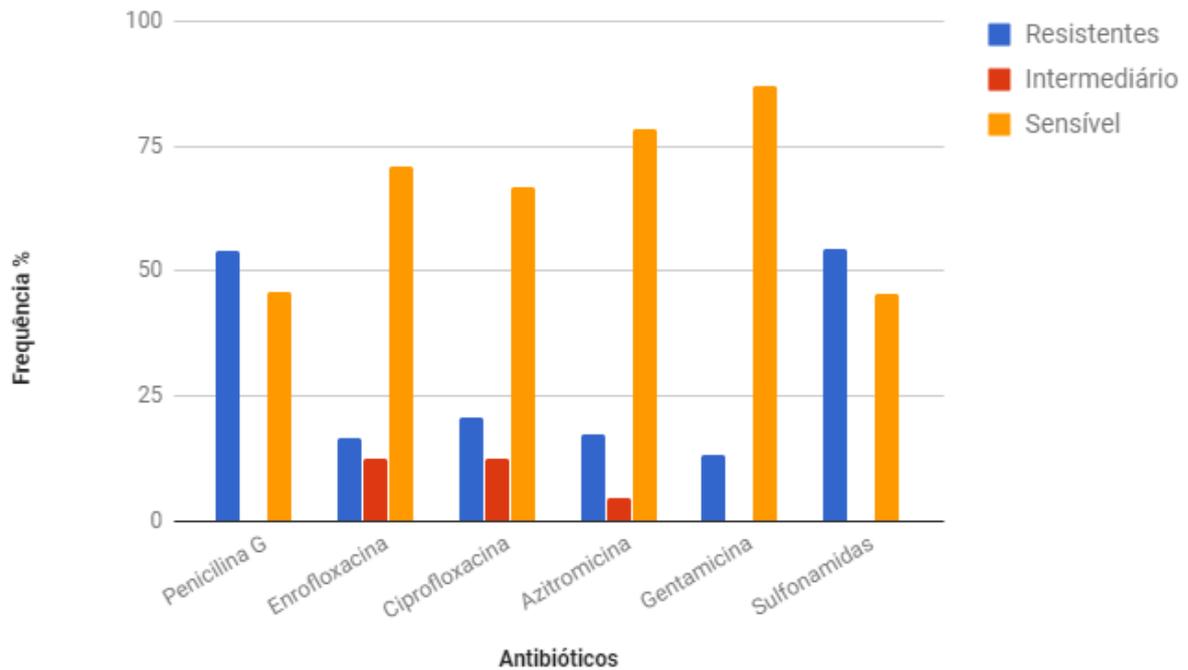


Figura 3 - Frequência de bactérias Gram-positivas resistentes a antibióticos.

As bactérias isoladas das amostras coletadas no arquipélago de Fernando de Noronha não apresentaram resistência aos antibióticos mais utilizados na ilha, identificados após entrevista ao Posto de Saúde e Hospital do Arquipélago realizada durante expedição de campo.

## 10. Discussão

Uma das causas mais comuns de mortalidade em aves silvestres em ambiente natural são as doenças bacterianas, destacam-se neste caso as bactérias do gênero *Clostridium*, as principais responsáveis pelas mortes causadas em aves silvestres (COOPER, 1993). *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* não beta-hemolíticos e *Staphylococcus*, são bactérias gram-positivas predominantes da microbiota normal da coana e da cloaca na maioria das aves (ALTMAN *et al.*, 1997). Quando isola-se bactérias das amostras de aves marinhas doentes, podem ser encontrados simbiontes, bem como patógenos primários, oportunistas ou secundários (SERAFINI; LUGARINI, 2014). Bactérias como *Borrelia garinii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium brunneum*, *Alcaligenes faecalis*, *Plesiomonas sp*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella newport* e *Edwardsiella tarda* já foram isoladas na para aves marinhas (UHART *et al.*, 2014). Cardoso *et al.* (2014) em seu trabalho com *Puffinus puffinus* publicou o isolamento de *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.*.

Um dos maiores problemas para a saúde pública encontrados atualmente é a resistência microbiana frente aos antibióticos (SANTOS, 2004). O presente estudo identificou que aproximadamente 53% das bactérias gram- negativas são resistentes a cefalexina, 52% ampicilina e 45 % são resistentes a amoxicilina. No caso de bactérias gram-positivas cerca de 54% são resistentes a penicilina e a sulfonamidas, notadamente bactérias gram positivas do gênero *Staphylococcus*. Tanto as bactérias Gram-negativas, quanto as Gram-positivas, a maioria se demonstraram sensíveis ao antibiótico Gentamicina. Essa resistência pode ser desenvolvida de uma forma natural, partindo da habilidade da população bacteriana de se desenvolver e se adaptar rapidamente. O uso indiscriminado de antibióticos, bem como a contaminação massiva no meio ambiente, aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade de exposição das espécies aos mesmos. Facilitando assim o desenvolvimento de mecanismos de resistência. (SANTOS, 2004).

Segundo dados do Ministério da Saúde (DISTRITO FEDERAL, 2014): ampicilina, amoxicilina, cefalexina e penicilina estão na lista dos medicamentos amplamente utilizados pela população brasileira. A partir do ano de 2010 a ANVISA (BRASIL, 2010) publicou a resolução RDC Nº 44/2010, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso exclusivo sob prescrição médica. Só a partir desse período a distribuição de antibióticos no país começou a ser controlada. Outra

constante ameaça do uso desenfreado de antibióticos está na criação de animais de produção, agricultura e nos efluentes de embarcações náuticas (ALLEN et al., 2010).

Estudos apontam que aves selvagens podem espalhar bactérias com potencial zoonótico e resistentes através da migração. Níveis de resistência das bactérias aos antibióticos são maiores quando há maior ação antrópica (BONNEDAHL; JÄRHULT, 2014). No entanto, devido ao fato de albatrozes e petréis não aproximarem-se do continente, sua exposição a atividades humanas é relativamente limitada. Se houver contaminação de bactérias resistentes na microbiota natural dos Procellariiformes, a mesma pode ter ocorrido através da transferência de plasmídeo contendo essa nova informação genética (resistência) para as bactérias “naturais” das aves. Mas para que essas novas bactérias consigam manter-se resistentes aos antibióticos, precisa existir constante pressão seletiva (presença do antibiótico) (BONNEDAHL; JÄRHULT, 2014).

É importante considerar ainda que o contato com antibióticos induzido pelo homem não é a única pressão seletiva que pode ocorrer em uma comunidade microbiana em animais, proporcionando possível resistência. Naturalmente as bactérias têm a capacidade de destruição ou inibição entre si. É natural os genes em comunidades microbianas conferirem resistência aos antibióticos como resposta de defesa e sobrevivência das colônias. Animais selvagens, naturalmente, fornecem diferentes mecanismos para a disseminação de genes de resistência a antibióticos, tais mecanismos devem ser melhor compreendidos juntamente com fatores externos (ENGERING; HOGERWERF; SLINGENBERGH, 2013).

Os resultados observados neste estudo nos mostram a diversidade bacteriana encontrada nos Procellariiformes, predominando as bactérias *Citrobacter freundii*. O monitoramento da microbiota e a determinação de origem de cepas resistentes devem ser tratados com extrema importância, tanto para a saúde pública quanto para a conservação (SOUSA, M. et al. 2014).

## **11. Recomendações para o manejo**

Entre as recomendações para o manejo, é possível recomendar que a seleção de eventual tratamento a ser empregado para Procellariiformes arribados que venham a ser atendidos em Centros de Reabilitação atente para os elevados padrões de resistência bacteriana aos antibióticos ampicilina, cefalexina e amoxicilina que foram observados nas aves oceânicas amostradas, notadamente para bactérias gram-negativas.

Outra recomendação importante é que sejam continuados os trabalhos de diagnóstico da diversidade microbiana em Procellariiformes, incluindo o maior número de espécie possível, pois apenas conhecendo-se o que é frequente e natural das espécies amostradas será possível identificar mudanças no padrão de saúde e prevalência de patógenos nas aves ao longo do tempo e sua relevância para as taxas reprodutivas e de sobrevivência.

## **12. Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Patricia Pereira Serafini, pela oportunidade de trabalho e orientação. Toda a equipe do CEMAVE também tem o meu agradecimento, pelas conhecimentos e momentos compartilhados. Queria agradecer também ao Rafael Meurer, pela ajuda dentro do laboratório e com os procedimentos. Ao professor Rubens Duarte e ao meu professor e também orientador Admir Giachini pelas sugestões e apoio. E meu último agradecimento ao ICMBio pela concessão da bolsa de iniciação científica.

### 13. Citações e referências bibliográficas

ALLEN, Heather K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.251-259, 1 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2312>.

ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; DORRESTEIN, G. M.; QUESENBERRY, K. editors. **Avian medicine and surgery**. Second ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Sanders, 1997.

BONNEDAHL, Jonas; JÄRHULT, Josef D.. Antibiotic resistance in wild birds. **Upsala Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 119, n. 2, p.113-116, 4 abr. 2014. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009734.2014.905663>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços de saúde. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (antigo NCCLS): Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **A biodiversidade na Zona Costeira e Marinha do Brasil**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/6618-a-biodiversidade-na-zona-costeira-e-marinha-do-brasil>>. Acesso em 10 jan. 2017.

BRASIL. Constituição (1999). Resolução da Diretoria Colegiada nº RDC Nº 44, de 26 de setembro de 2010. **Resolução da Diretoria Colegiada – Rdc Nº 44, de 26 de Outubro de 2010.**: Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/RDC ANVISA Nº 44 DE 26 DE OUTUBRO DE 2 010 CONTROLE DE ANTIMICROBIANOS.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf)>. Acesso em: 09 jan. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – 8º Edição**. 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_opasm2-a8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm2-a8.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

BRASILIA. PLANACAP. Ministério do Meio Ambiente. **Plano De Ação Nacional Para a Conservação Dos Albatrozes e Petréis**. 2013. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-albatrozes/matriz-planejamento-atualizada-planacp-2013.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2017

CARDOSO, Maíra et al. The Manx shearwater (*Puffinus puffinus*) as a candidate sentinel of Atlantic Ocean health. **Aquatic Biosystems**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.6-0, 01 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-9063-10-6>. Disponível em: <<https://aquaticbiosystems.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-9063-10-6>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

COOPER, J. E. **Historical survey of disease in birds**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 24, p. 256-264, 1993.

DISTRITO FEDERAL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 9. ed. Brasília: Editora Ms, 2014. 226 p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao\\_nacional\\_medicamentos\\_essenciais\\_rena\\_me\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_essenciais_rena_me_2014.pdf)>. Acesso em: 08 jan. 2017.

ENGERING, Anneke; HOGERWERF, Lenny; SLINGENBERGH, Jan. Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. **Emerging Microbes & Infections**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.1-7, fev. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2013.5>.

FREITAS, Cícero Carlos. **O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos**. J. Bras. De Doenças Sex. Transm., Rio de Janeiro, v. 1, N. 3, Out./Nov./Dez. 1989.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. 2005. **How many species are there in Brazil?** Conservation Biology, 19: 619-624.

MARIANI, Daniela Bueno. **Causas de encalhes de aves marinhas no nordeste do Brasil**. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: <[http://ww2.pgvet.ufrpe.br/sites/ww2.prppg.ufrpe.br/files/2016.dissertacao-daniela\\_bueno\\_mariani.pdf](http://ww2.pgvet.ufrpe.br/sites/ww2.prppg.ufrpe.br/files/2016.dissertacao-daniela_bueno_mariani.pdf)> . Acesso em: 05 jan. 2017.

MEURER, R. **Estudo Comparativo entre a Microbiota de Ninhos Artificiais ocupados por Papagaio-de-cara-roxa Amazona brasiliensis (Linnaeus, 1758) (Aves: Psittacidae) em Vida Livre**: Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina, 1ºEd. Florianópolis, 2015

NEVES, T.S.; OLMOS, F.; PEPES, F. & MOHR, L.V. 2006. **Plano de Ação Nacional para a conservação de albatrozes e petréis**. Brasília, IBAMA.

ONLEY, D., SCOFIELD, P., 2007. **Albatrosses, Petrels and Shearwaters of the World**. Christopher Helm, London.

PHILLIPS, R. A., GALES, R., BAKER, G. B., DOUBLE, M. C., FAVERO, M., QUINTANA, F., ... & WOLFAARDT, A. (2016). **The conservation status and priorities for albatrosses and large petrels**. Biological Conservation, 201, 169-183.

PIACENTINI, V. D. Q., ALEIXO, A., AGNE, C. E., MAURICIO, G. N., PACHECO, J. F., BRAVO, G. A., ... & SILVEIRA, L. F. (2015). **Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos**. Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology, 23(2), 90-298.

SANTOS, Neusa de Queiroz. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** Florianópolis, p.64-70, 12 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

SERAFINI, Patricia Pereira. Instituto Albatroz. Projeto Albatroz (Ed.3). **Boletim Técnico Científico do Projeto Albatroz: Avanços Internacionais no Monitoramento da Saúde das Populações de Albatrozes e Petréis e a Participação do Brasil nestas Iniciativas.** Santos, 2016. Disponível em:<<https://www.google.com.br/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=boletim+tecnico+albatroz+2016>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

SERAFINI, Patricia Pereira; LUGARINI, Camile. Procellariiformes e outras aves do ambiente marinho (Albatroz, Petrel, Fragata, Atobá, Biguá e Gaivota). In: CUBAS, Zalmir Silvino; SILVA, Jean Carlos Ramos; CATÃO-DIAS, José Luiz. **Tratado de animais selvagens:** Medicina Veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap. 23. p. 417-440.

SOUSA, M. et al. **Antimicrobial resistance determinants in Staphylococcus spp. recovered from birds of prey in Portugal:** Veterinary Microbiology 436-440p. Amsterdam: Elsevier, 2014.

UHART. M et al. Second meeting of the population and conservation status working group. **Progress on updated review of pathogens described in ACAP species.** Punta del Este: 2014. 33 p.

WEIMERSKIRCH, H. **Diseases threaten Southern Ocean albatrosses.** Polar Biol. 27: 374-379. 2004. Disponível em: <<http://www.cebc.cnrs.fr/publipdf/2004/WPB27.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

WINN JR, W. et al. **Koneman diagnóstico microbiológico:** texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1565 p. 2012.