



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
(2015-2016)

**Avaliação da microbiota cloacal e de orofaringe de cardeais-
amarelos (*Gubernatrix cristata*) vinculados ao programa de
cativeiro da espécie**

Ana Carolina Schmitz da Silva
Orientadora: Camile Lugarini

Florianópolis
Agosto 2016

1. Resumo

O cardeal-amarelo, *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817), possui distribuição restrita ao bioma Pampa no Brasil, na Argentina e no Uruguai. A espécie possui poucos registros de ocorrência na natureza em território nacional e as principais ameaças incluem a captura ilegal e a fragmentação de hábitat. Por estar classificada como criticamente ameaçada na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção, a espécie foi incluída no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho (PAN Campos Sulinos). Como parte do Plano de ação, foi criado em 2014 o Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo, que tem como objetivo garantir condições sanitárias adequadas para indivíduos recuperados do tráfico ilícito, possibilitando o aumento da população cativa e a realização de solturas na natureza para a recuperação da espécie no ambiente natural. Como parte da investigação de patógenos constantes no protocolo do Programa de Cativeiro da espécie, realizou-se a caracterização da microbiota de animais mantidos em dois mantenedores participantes do Programa, e verificou-se a possível resistência a antibióticos das colônias isoladas. A microbiota dos cardeais-amarelos foi composta predominantemente por bactérias Gram-positivas da família Staphylococcaceae (59,26%), seguida por bactérias da família Enterobacteriaceae (59,24%). A resistência a antibióticos foi de 69,88% das colônias isoladas, sendo que 25,86% delas foram multirresistentes. Não houve relação entre a diversidade de bactérias e a resistência aos antibióticos com a incidência de doenças e sucesso reprodutivo. O presente trabalho apresentou, pela primeira vez, a caracterização da microbiota da espécie em cativeiro, composta principalmente por bactérias Gram-positivas, com alto grau de resistência a antibióticos, informações importantes para embasar a manutenção em cativeiro e as futuras reintroduções.

Palavras-chave: *Caracterização bacteriana, resistência antibiótica, saúde animal.*

2. Abstract

The Yellow Cardinal, *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817), has a restricted distribution within the Pampa biome in Brazil, Argentina and Uruguay. The species has few records in Brazilian natural territory and has been threatened by hunting and habitat fragmentation. Because it is classified as critically endangered on the Brazilian Official List of Threatened Species, the species was included in the National Action Plan for the Conservation of Threatened Passerines from the Grassland and Espinilho (PAN Grassland). The Captive Program of Yellow Cardinal was created as part of the Action Plan, which has the objectives of ensuring adequate sanitary conditions for individuals recovered from the illegal trade and increasing captive population in order to release selected individuals back to the wild. As a part of pre-defined protocols this study aimed to characterize the microbiota of the birds in two holders of the Captive Program. In addition, it was assessed the resistance to antibiotics of isolated microorganisms. The microbiota of Yellow Cardinal were predominantly composed by Gram-positive bacteria from *Staphylococcaceae* family (59.26%), followed by *Enterobacteriaceae* (59.24%). Resistance to antibiotics was in the order of 69.88%, with 25.86% of them multidrug-resistant. There was no relation between diversity of bacteria and their resistance to antibiotics with the disease incidence and reproductive success. This study presented a first assessment to the Yellow Cardinal *ex-situ* microbiota and antimicrobial resistance patterns, composed especially by Gram-positive bacteria, with high level of resistance to antibiotics. This information will guide the maintenance in captivity and future reintroductions.

Key words: *Bacterial characterization, antibiotic resistance, animal health.*

3. Lista de Figuras

FIGURA 1 - RECINTOS DE INDIVÍDUOS DE CARDEAL-AMARELO PAREADOS NO CRIADOURO CIENTÍFICO PARA FINS DE CONSERVAÇÃO ONÇA PINTADA.	4
FIGURA 2 - RECINTO EXTERNO DE CARDEAIS-AMARELO SEM CONTATO COM O PÚBLICO, NO GRAMADO ZOO. .	5
FIGURA 3 - DETALHES DE UMA DAS PLACAS QUE EXPLICAM PARA O PÚBLICO DO GRAMADO ZOO PROGRAMA DE CATIVEIRO DO CARDEAL-AMARELO.....	5
FIGURA 4 - RECINTO DE EXPOSIÇÃO DO CARDEAL-AMARELO NO GRAMADO ZOO.	6
FIGURA 5 - RECINTOS ONDE SE ENCONTRAM CARDEAIS-AMARELOS NO GRAMADO ZOO.....	6
FIGURA 6 - TESTE DE ANTIBIOGRAMA APÓS 24H DE CRESCIMENTO.....	8
FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS (GN) E GRAM-POSITIVAS (GP) EM CARDEAIS-AMARELOS DE DOIS MANTENEDORES DO PROGRAMA DE CATIVEIRO DA ESPÉCIE.....	10
FIGURA 8 - DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS IDENTIFICADAS E SUAS FREQUÊNCIAS EM CARDEAIS-AMARELOS DE DOIS MANTENEDORES DO PROGRAMA DE CATIVEIRO DA ESPÉCIE.	11
FIGURA 9 - FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.....	12

4. Lista de Abreviaturas e Símbolos

AMC	Amoxicilina
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZI	Azitromicina
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFL	Cefalexina
CIP	Ciprofloxacina
ENO	Enrofloxacina
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
EPM	Rugai sem Sacarose
ESEC	Estação Ecológica
G_{adj}	Símbolo de ferramenta estatística
GEN	Gentamicina
GI	Grau de liberdade
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
LTD	Meio para hidrólise da ureia e desaminação do triptofano
MiLi	Meio para Motilidade, Indol e Lisina
NCLI	NationalConservationLeadershipInstitute
PAN	Programa de Ação Nacional
PEN	Penicilina
PR	Paraná
SP	São Paulo
SUL	Sulfonamidas
TET	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colônias
χ^2	Símbolo do teste estatístico de Qui quadrado

5. Sumário

1. Resumo	i
2. Abstract.....	ii
3. Lista de Figuras	iii
4. Lista de Abreviaturas e Símbolos	iv
5. Sumário.....	v
6. Introdução	1
7. Objetivo Geral:.....	3
8. Material e Métodos.....	4
9. Análise estatística	8
10. Resultados.....	10
3 Discussão e Conclusões.....	1
11. Recomendações para o Manejo.....	3
Agradecimentos	4
12. Referências bibliográficas	5

6. Introdução

O cardeal-amarelo era considerado escasso no Brasil nas décadas de 1970 e 1980 e atualmente subsiste em números extremamente reduzidos na natureza (SERAFINI, 2014). Registros brasileiros provêm das porções oeste e sul do Estado do Rio Grande do Sul, principalmente junto à fronteira com o Uruguai, mas há também, registros de ocorrência no leste da Argentina (DIAS, 2008). Segundo a Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014), a espécie está criticamente ameaçada e vem sendo prejudicada por fatores de ameaça comuns para aves silvestres, como a caça e a constante fragmentação de habitat (SERAFINI, 2014).

Os Planos Nacionais para a Conservação de espécies ameaçadas (PANs) tem como objetivo definir ações *ex situ* e *in situ* que corroborem com a preservação e recuperação de espécies ameaçadas de extinção. O Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) está inserido no Plano Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho, estabelecido pela Portaria N° 49, de 30 de abril de 2014 (SERAFINI, 2014).

O objetivo do Programa de Cativeiro do Cardeal amarelo tem como um dos focos o de estimular o crescimento da população em cativeiro, além de aumentar conhecimento científico sobre a espécie em questão (SERAFINI, 2014). Nesse contexto, a caracterização da microbiota dos indivíduos é de extrema importância para sinalizar possíveis causas de problemas na saúde dos animais. Além disso, o entendimento da microbiota de aves reflete a coevolução de microrganismos com seus hospedeiros, desempenhando um papel fundamental no crescimento, resposta imune e desenvolvimento de doenças (ECKBURG et al., 2005).

As atividades humanas frequentes, que possuem interação com animais selvagens, podem promover genes de resistência antibiótica e espalhá-los em seus habitats (SANTOS, 2013). Além disso, a resistência a antibióticos continua a ser uma ameaça para a saúde pública atualmente (SOUSA et al., 2014), por isto, é relevante entender as dinâmicas relacionadas à resistência antimicrobiana de animais silvestres cativos.

As relações estabelecidas entre microrganismos e animais ainda não são bem delimitadas. Um conjunto de micro habitats se estabelece ao longo do sistema gastrointestinal, e a distribuição e função de determinados microrganismos é específica dentro do sistema como um todo, ao passo que, quaisquer alterações, sejam elas físicas ou fisiológicas, podem influenciar na manutenção da biota e facilitar o crescimento de microrganismos patogênicos,

que conseqüentemente irão gerar doenças infecciosas (TORTORA et al., 2000; MELVILLE, 2004).

Considerando que a população mantida em cativeiro não é numerosa, há uma preocupação em relação ao prejuízo que uma doença infecciosa possa causar em caso de epizootia (SMITH et al., 2009). Somado a isto, o efeito sinérgico de interações com outras ameaças também pode ser prejudicial para as espécies em vias de extinção (HEARD et al., 2013).

Fatores influentes sobre a composição da microbiota gastrintestinal, quando identificados como causadores de morbidade, mortalidade, redução da aptidão (*fitness*), incluindo menor sucesso reprodutivo, são os alvos de investigações microbiológicas e a caracterização taxonômica do que é mais prevalente se torna bastante importante para diagnosticar cenários de coevolução, segundo estudo de meta-análise de trabalhos publicados com caracterização de microbiota de aves (WAITE e TAYLOR, 2014) A partir da caracterização da microbiota se pode demonstrar ainda a prevalência de agentes com potencial zoonótico e subsidiar a compreensão da correlação entre microrganismos e a situação sanitária dos indivíduos em cativeiro desta espécie em questão. Portanto, estes dados poderão ser utilizados como ferramenta para a escolha de candidatos à soltura prevista no Programa de Cativeiro.

7. Objetivo Geral:

Identificar a microbiota cloacal e de orofaringe dos cardeais-amarelos mantidos em cativeiro, em instituições vinculadas ao Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo.

7.1 Objetivo Específico:

Determinar os padrões microbiológicos normais de indivíduos saudáveis da espécie, abordando desta maneira a saúde destas populações e a viabilidade da inclusão de espécimes em iniciativas de manejo para reintrodução/revigoramento populacionais conforme planejamento prévio (Meta 3 do Programa de Cativeiro: “*Liberar experimentalmente na sua área original de ocorrência, pelo menos três grupos (unidades sociais) de cardeais-amarelos até 2017*”).

Relacionar a ocorrência de determinadas bactérias na microbiota com a incidência de doenças e sucesso reprodutivo.

Verificar possível resistência bacteriana a antibióticos e relacioná-la com a incidência de doenças e sucesso reprodutivo.

8. Material e Métodos

A colheita das amostras ocorreu no criadouro científico para fins de conservação Onça Pintada, localizado na cidade de Curitiba, Paraná, no dia 09 de setembro de 2014; e no Zoológico de Gramado, localizado na cidade de Gramado, no Rio Grande do Sul, no dia 19 de fevereiro de 2016. Ambos são mantenedores integrantes do Grupo de Trabalho do Programa de Cativeiro dos Cardeais-amarelos.

O criadouro Onça Pintada abriga 25 indivíduos de *Gubernatrix cristata*. Os oito espécimes pareados são mantidos em recintos grandes de metragem variável (aproximadamente de 2m x 1,5m), com barreiras visuais e enriquecidos com vegetação (arvoretas e arbustos), apresentados na Figura 1. Os machos não pareados são mantidos em pequenos recintos individuais, mais próximos à área de manejo dos tratadores e sem enriquecimento ambiental. Há registros de três filhotes nascidos no criadouro, sendo um deles, nascido na estação reprodutiva anterior da coleta, em 2014. A alimentação é composta por mistura de sementes e ração comercial para passeriformes e água *ad libitum*.



Figura 1 - Recintos de indivíduos de cardeal-amarelo pareados no criadouro científico para fins de conservação Onça Pintada.

No Gramado Zoo, são abrigados 25 indivíduos da espécie com 22 pareados e seis casais com registros de nascimento de filhote, durante períodos reprodutivos anteriores. Dentre estes, dois casais são mantidos em recintos externos, isolados do público (Figura 2), e

um casal é mantido exposto ao público (Figura 3), em recinto enriquecido com arbustos semelhantes aos encontrados no habitat natural da espécie (Figura 4), como forma de promover a conscientização ambiental aos visitantes. Todos os outros indivíduos são mantidos em local fechado com janelas isoladas por telas, que possibilitam a entrada de luz solar e ventilação. Os indivíduos são distribuídos em pares entre as diferentes gaiolas (Figura 5).



Figura 2 - Recinto externo de cardeais-amarelo sem contato com o público, no Gramado Zoo.



Figura 3 - Detalhes de uma das placas que explicam para o público do Gramado Zoo Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo.



Figura 4 - Recinto de exposição do cardeal-amarelo no Gramado Zoo.



Figura 5 - Recintos onde se encontram cardeais-amarelos no Gramado Zoo.

Toda a manipulação das aves silvestres foi realizada mediante o uso de equipamentos de proteção individual (EPI's), incluindo óculos de proteção, máscara de proteção e luvas de látex.

As amostras colhidas foram mantidas em meio de transporte Stuart, para o transporte até o Laboratório de Águas e Microbiologia da Estação Ecológica de Carijós (Esec Carijós), Florianópolis, Santa Catarina. Em até 48 h após a colheita, as amostras foram repicadas no meio *Brain Heart Infusion* (BHI), na proporção de 70µl para 30µl de glicerina, com o intuito de preservar as células dos microrganismos presentes e garantir posterior análise do material (MEURER, 2014). Após a repicagem em BHI, todas as amostras foram congeladas à -20°C.

A identificação da microbiota cloacal e oral ocorreu entre os meses de agosto de 2015 a junho de 2016. As amostras descongeladas foram repicadas por meio de estrias em placa inclinada em ágar MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram-negativas, e no ágar Sangue, meio não seletivo preparado com sangue de carneiro liofilizado. Após 24 h de incubação à 37°C, as colônias foram analisadas segundo critérios morfológicos, de acordo com Winn et al. (2012). Após a triagem, foi realizada a coloração de Gram, por meio do kit da New Prov (Santa Cecília, SP), seguindo recomendações do fabricante. Para as colônias Gram-positivas presentes no ágar Sangue foi realizado o teste catalase, que determina a presença da enzima catalase, adicionando algumas gotas de peróxido de hidrogênio a uma colônia isolada. Para os isolados com resultado de catalase positivo, foi aplicado o *Staphy-Test* (Probac do Brasil, Santa Cecília, SP), que utiliza a capacidade do *Staphylococcus aureus* de aglutinar hemácias para a identificação do grupo estafilococos coagulase positivos (WINN et al., 2012).

As colônias com crescimento no ágar MacConkey foram submetidas ao teste de oxidase em fita (New Prov, Pinhais, PR), quando apresentavam fermentação de lactose negativa, com o intuito de identificar bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Após a leitura do teste, as amostras Gram-negativas foram repicadas a partir do ágar MacConkey, no Ágar Tríplice açúcar ferro (TSI), que possibilita a análise de fermentação de três açúcares e a produção de ácido sulfídrico (H₂S). Além disso, as amostras foram repicadas no *Enterokit* (Probac do Brasil, São Paulo, SP), composto por tubos com oito testes bioquímicos em três meios diferentes: meio Rugai sem sacarose (EPM), que contém os testes de fermentação e produção de gás em glicose, produção de H₂S, hidrólise da ureia e desaminação do triptofano (LTD); o meio Motilidade, Indol e Lisina (MiLi), que contém os testes de motilidade, indol e descarboxilação de lisina; e o meio Citrato de Simmons, que propicia um meio com citrato como única fonte de carbono às bactérias. A incubação do *Enterokit* e TSI ocorreram durante 24 h à 37°C e foram interpretadas segundo recomendações do fabricante, que disponibiliza um sistema numérico a partir da positividade para os testes,

além da fermentação da lactose observada na placa de MacConckey e interpretação do TSI segundo recomendações da ANVISA (BRASIL, 2004).

O teste de resistência a antibióticos foi baseado na metodologia de disco difusão descrito por Bauer e Kirby (1966). Todas as amostras foram devidamente suspensas em solução salina (0,85%) até atingir turbidez similar ao grau 0,5 da escala *Mac Farland* (1×10^6 UFC/mL) a partir das colônias previamente isoladas (entre 24 e 48 h), e posteriormente semeadas, utilizando suabe estéril em placas com ágar Muller Hinton. Onze discos de antibióticos foram utilizados: gentamicina (GEN), penicilina (PEN), azitromicina (AZI), sulfonamidas (SUL), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENO) para as bactérias identificadas como Gram-negativas e tetraciclina (TET), cefalexina (CFL), ampicilina (AMP), amicacina (AMI) e amoxicilina (AMC) para as bactérias Gram-positivas, segundo instruções do fabricante. O diâmetro do halo de inibição obtido nas análises de resistência a antibióticos (Figura 6) determinou a classificação do isolado como resistente ou sensível segundo parâmetro do NCLI (BRASIL, 2005), com controle por *Klebsiella oxytoca* (ATCC43086).



Figura 6 - Teste de antibiograma após 24h de crescimento.

9. Análise estatística

A prevalência das bactérias isoladas foi calculada pelo número de indivíduos infectados *vs.* indivíduos analisados. Foi utilizado o teste G com ajuste para pequenas amostras (G_{adj}) ou o teste Qui-quadrado com correção contínua de Yates para verificar as seguintes relações e testar as hipóteses:

- Diferença na prevalência de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas na microbiota oral e cloacal;
- Heterogeneidade de bactérias isoladas na microbiota oral e cloacal;
- Testar a hipótese de que maior prevalência de bactérias Gram-negativas influencia a incidência de doenças (micoplasmose, clamidiose, salmonelose e sarna);
- A relação entre predominância de bactérias Gram-negativas ou positivas e o sucesso reprodutivo (número de ovos e filhotes produzidos);
- Relação entre o criadouro ou zoológico e a frequência de isolados resistentes ou multirresistentes;
- Testar a hipótese de que as amostras orais e cloacais não apresentam diferença de resistência a um ou mais antibióticos;
- Testar a hipótese de que Gram-negativas e positivas também não se diferem quanto ao número de antibióticos aos quais apresentam resistência;
- A influência das colônias bacterianas resistentes e a saúde dos hospedeiros, bem como seu sucesso reprodutivo.

Todos os testes estatísticos foram ajustados somando-se 1 a cada valor para eliminar os valores nulos, quando da sua necessidade. Todos os testes foram realizados no programa Excel com a extensão PopTools (HOOD, 2011).

10. Resultados

No criadouro Onça Pintada foram colhidas 26 amostras, sendo nove cloacais e 17 orais, provenientes de 17 indivíduos: 12 machos e cinco fêmeas. Já no Gramado Zoo foram colhidas 50 amostras, sendo 25 delas cloacais e 25 orais. De todas as amostras analisadas, 55,26% apresentaram uma ou mais colônias de bactérias, sendo 65,43% Gram-positivas e 34,57% Gram-negativas (Figura 7). As bactérias identificadas foram, na seguinte frequência: *Staphylococcus* spp. (57,83%), *Citrobacter freundii* (8,43%), *Escherichia coli* (7,23%), *Enterobacter aerogenes* (6,02%), *Serratia liquefaciens* (4,82%), *Bacillus* spp. (3,61%), *Enterobacter gergoviae* (3,61%), *Streptococcus* spp. (2,41%), *Kebsiella oxytoca* (2,41%), *Enterobacter agglomerans* (2,41%) e *Enterobacter cloacae* (1,20%) (Figura 8).

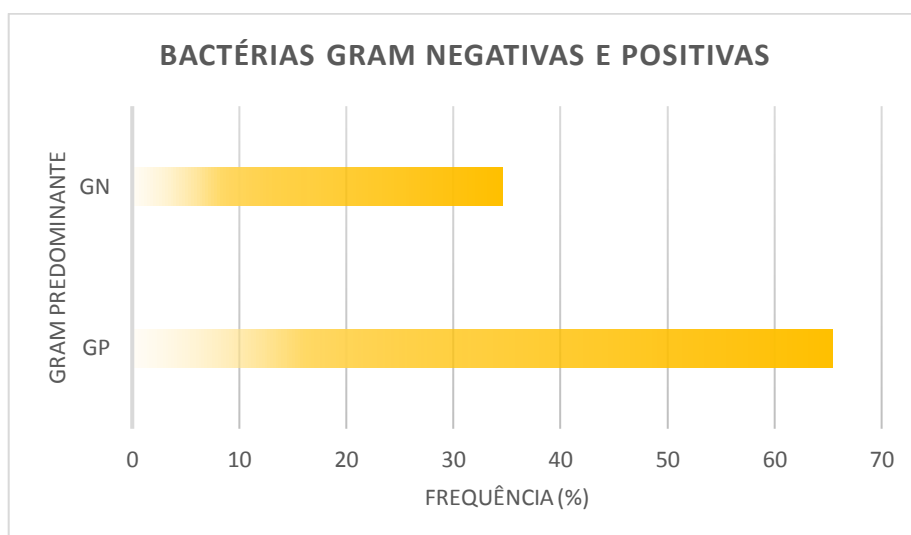


Figura 7 - Frequência de bactérias Gram-negativas (GN) e Gram-positivas (GP) em cardeais-americanos de dois mantenedores do Programa de cativeiro da espécie.

A microbiota oral e cloacal foi considerada homogênea tanto para a prevalência de isolados Gram-positivos e Gram-negativos ($G_{adj}=16,56$, $gl=10$, $p=0,08$), como cada espécie de bactéria ($G_{adj}=6,42$, $gl=10$, $p=0,77$). A prevalência de bactérias Gram-negativas não influenciou a incidência de doenças ($G_{adj} = 2,33$, $gl=1$, $p=0,12$) ou o sucesso reprodutivo ($\chi^2 = 0,04$, $gl=1$, $p=0,82$).

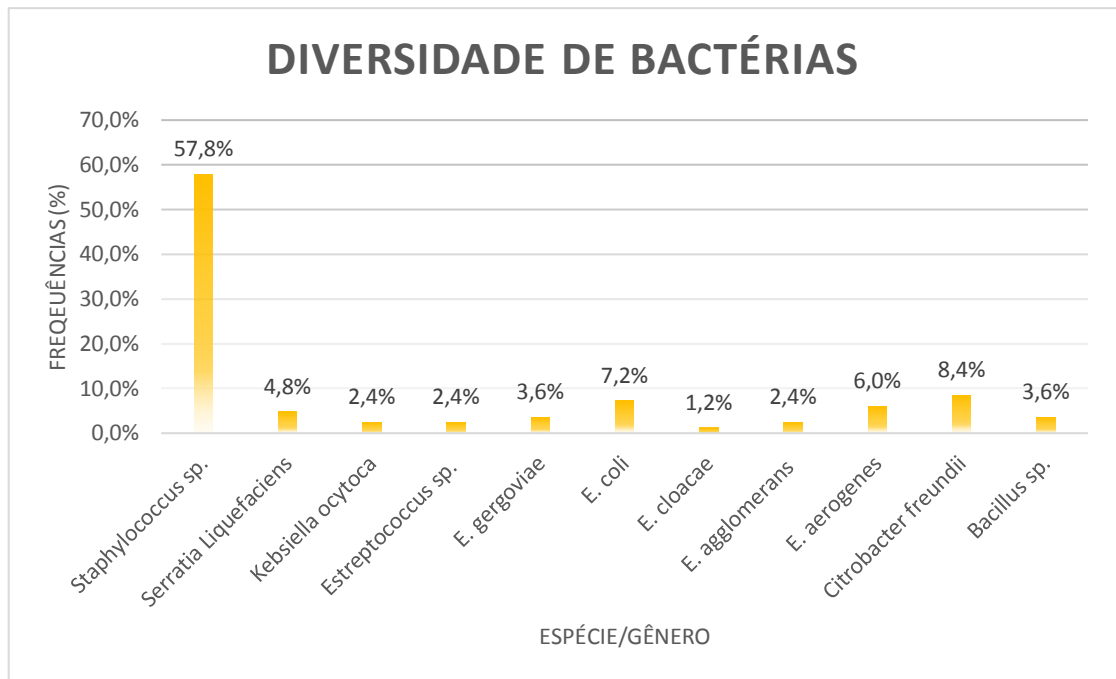


Figura 8 - Diversidade de bactérias identificadas e suas frequências em cardeais-amarelos de dois mantenedores do Programa de cativeiro da espécie.

A resistência a antibióticos foi 69,88% nas colônias isoladas em ambos os locais (criadouro Onça Pintada e Gramado Zoo), dentre as quais, quatro gêneros apresentaram resistência em todas as cepas amostradas (Figura 9). Todas as amostras analisadas apresentaram resistência para algum dos antibióticos testados (Tabela 1). Não houve relação entre o criadouro e a frequência de amostras resistentes ($\chi^2=0,05$, gl=1, p=0,81) ou multirresistentes ($\chi^2=1,45$, gl=1, p=0,22). Não houve relação entre amostras orais e cloacais ($G_{adj}=5,14$, gl =5, p =0,39) e resistência a antibióticos. Não houve relação entre a prevalência de bactérias Gram-negativas e positivas ($G_{adj}=8,67$,gl=5, p= 0,12), e resistência a antibióticos. A incidência de doenças ($G_{adj}=0,94$,gl=1, p=0,33) e o sucesso reprodutivo não foram influenciados pela resistência a antibióticos ($G_{adj}=0,86$, gl=1, p=0,5).

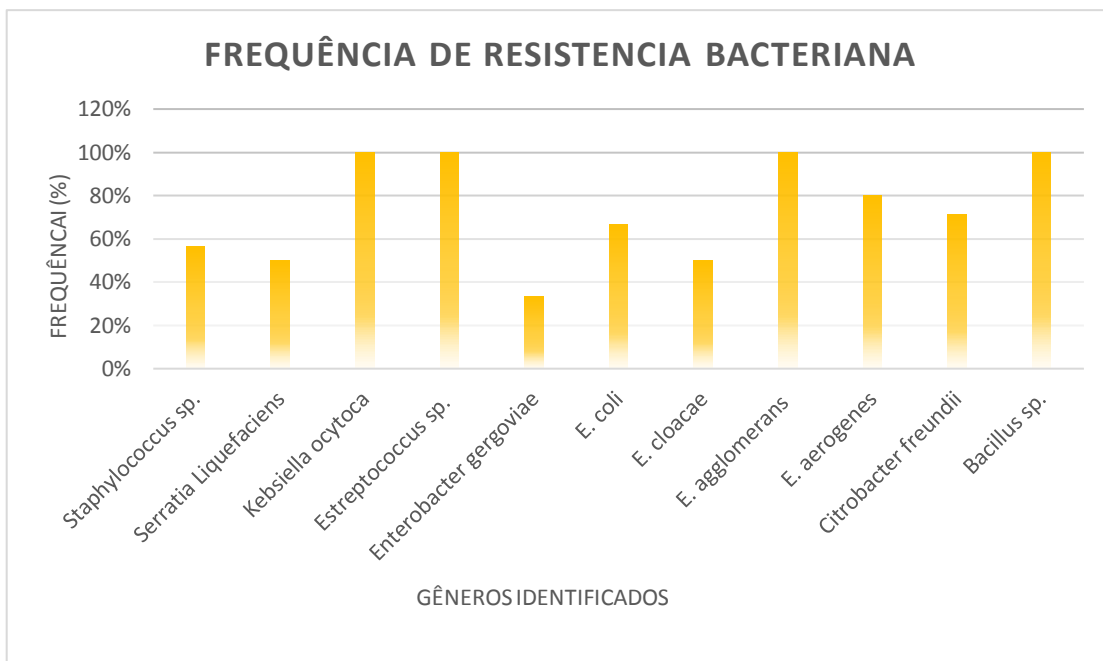


Figura 9 - Frequência de bactérias resistentes a antibióticos.

Tabela 1 - Relação entre cepas resistentes e os antibióticos utilizados.

ANTIBIÓTICOS	GRAM-NEGATIVAS						GRAM-POSITIVAS				RESISTENÇA POR ANTIBIÓTICO
	<i>Klebsiella ooytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	
AMP	1	6	2	0	1	1	0	0	0	0	13,25%
AMC	0	5	2	1	0	1	0	0	0	1	12,05%
AMI	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	3,61%
AZI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2,41%
CIP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3,61%
CFE	1	5	3	1	0	1	1	0	0	0	14,46%
ENO	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	6,02%
GEN	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	7,23%
PEN	0	0	0	0	0	0	0	2	2	9	15,66%
SUL	1	1	1	0	1	0	0	2	1	9	19,28%
TET	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2,41%
TOTAL	4	18	8	2	4	3	5	6	4	29	-

11. Discussão e Conclusões

Entender a microbiota do sistema gastrointestinal das aves é de grande importância para relacionar a presença de microrganismos e doenças infecciosas. Comumente, não há uma homogeneidade microbiológica entre todo este sistema, e segundo os resultados apresentados, não houve diferença significativa entre amostras de origem oral e cloacal, que compreendem as partes com maior contato com o ambiente externo (HIRSH e ZEE, 1999; MELVILLE, 2004; TORTORA et al., 2000). Esperava-se encontrar incidência maior de Gram-negativas nas amostras cloacais, porém, as amostras apresentaram maior frequência de bactérias Gram-positivas, com predominância de *Staphylococcus* spp., um gênero bastante comum em amostras cloacais de aves (ANDREASEN, 2003; SANTOS, 2010). A família dos estafilococos, composta por bactérias Gram-positivas, é comumente encontrada na microbiota natural da pele, nariz e boca dos seres humanos e animais. Estas bactérias oportunistas podem causar uma série de doenças, desde infecções de pele até doenças potencialmente fatais (SOUSA, 2014; WALSH e FANNING, 2008). Apesar de comum a presença deste grupo de bactérias nos indivíduos amostrados poderia estar relacionada, ao contato com humanos durante o manejo de cativeiro e alimentação das aves, especialmente de *S. aureus*, entretanto esta espécie não foi encontrada.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são amplamente encontradas na natureza e na microbiota animal, podendo estar associadas a doenças infecciosas (WINN et al., 2012). Estão relacionadas a infecções em passeriformes, podendo ser encontradas como patógenos, oportunistas, associados ou não, com infecção viral, parasitária ou fúngica (JOSEPH, 2003; HORN, 2015). Todavia, não houve relação significativa com a presença de Gram-negativas e a incidência de doenças nos animais amostrados, assim como não houve relação entre a diversidade microbiana e histórico de doenças.

Apesar dos dados não apontarem relação entre resistência microbiana e incidência de doenças, a colônia de *Enterobacter cloacae* apresentou resistência para ampicilina e faz parte da microbiota de um indivíduo que também tem histórico de doença. Segundo Lu et al. (2003) essa relação explica-se pelo fato de que a microbiota intestinal é afetada por muitos fatores, assim como dieta, ambiente, administração de antibióticos e infecção por organismos patógenos.

Nossos resultados não apontaram influência entre o sucesso reprodutivo de aves e a predominância de bactérias Gram-negativas/positivas, ou em relação a diversidade de espécies associadas. Entretanto, é importante salientar, que a microbiota do trato gastrointestinal influencia a saúde, o crescimento e a resposta imune dos animais (SANTOS, 2013) e que estas relações ainda não são bem delimitadas entre diferentes espécies de aves. Apesar da não significância entre sucesso reprodutivo e incidência bacteriana, observou-se no Gramado Zoo, maior atividade reprodutiva entre casais mais distantes de outros indivíduos da espécie, e com recintos mais enriquecidos ambientalmente, fatores estes, considerados externos a microbiota dos animais, mas que influenciam positivamente o bem-estar animal (MENDONÇA-FURTADO, 2006), e que podem facilitar o sucesso reprodutivo dos cardeais.

A diversidade de bactérias na microbiota de aves de cativeiro e silvestres da espécie *Tetrao urogallus* foi maior para indivíduos de vida livre, sugerindo-se que a estrutura da comunidade microbiana do ceco é importante para a sobrevivência durante a temporada de inverno e que as diferenças observadas para as aves selvagens podem explicar a alta mortalidade de animais cativos quando libertados no ambiente natural (WIENEMANNA, 2011). Não se tem dados sobre a microbiota de cardeais-amarelos selvagens, estudo que seria de grande importância para garantir que os indivíduos candidatos à soltura não sofressem impactos negativos no processo de reintegração com o ambiente natural.

A resistência das colônias de bactérias em cardeais-amarelos pode ter sido adquirida devido a utilização de antibióticos para tratamento de doenças bacterianas em cativeiro, podendo ter sido naturalmente produzida pelos microrganismos, após pressão seletiva. Além disso, há possibilidade de trocas de materiais genéticos entre bactérias de diferentes origens e o papel de plasmídeos na transmissão do potencial de resistência a antimicrobianos tem sido amplamente discutida (GIBBS et al., 2007; KOSHLAND, 1994; SANTOS, 2010). O contato com seres humanos também pode ser um meio de transmissão de bactérias resistentes (SANTOS, 2010). A identificação das espécies e dos genes relacionados à resistência antibiótica são pontos importantes a serem considerados em novos trabalhos com os cardeais-amarelos, visto que há uma relação com doenças graves em humanos e animais, e que animais selvagens podem vir a ser propagadores de genes resistentes na natureza (SOUSA, 2014).

A identificação das bactérias possibilitou um panorama sobre a predominância de *Staphylococcus* spp., porém, a identificação em nível de espécie tem significância maior, visto que a família em questão pode estar relacionada com problemas de saúde pública (SOUSA, 2014). Este trabalho apresentou resultados importantes sobre a dinâmica de resistência e a diversidade bacteriana predominantes em cardeais cativos.

12. Recomendações para o Manejo

Segundo resultados apresentados, a diversidade microbiana identificada não apresenta riscos imediatos para a saúde dos animais do Programa de Cativeiro analisados até o momento. Contudo, estudos mais aprofundados na microbiota normal de animais da mesma espécie em vida livre devem ser obtidos a fim de permitir a comparação e a compreensão sobre a viabilidade da inclusão destes espécimes cativos em iniciativas de manejo para reintrodução/revigoração populacionais, considerando notadamente a resistência a antimicrobianos encontrada.

A questão da resistência é de importância para a sociedade atual, e por isso deve-se ter precauções diante da possibilidade de transmissão de cepas resistentes, dos animais para os seres humanos e vice-versa. Sugere-se então, que pessoas em contato com as aves na manutenção do ambiente e fornecimento de alimentos, utilizem EPI's para garantir que não haja contaminação microbiológica. Além disso, a transmissão pode ser a partir de humanos para as aves, que podem futuramente estar levando cepas resistentes à natureza, quando ocorrer a soltura. Ainda que a resistência a antibióticos possa ser causada por vias naturais, a propagação de bactérias resistentes pode ser negativa tanto para as aves que serão soltas, pelo fato de estarem entrando em um ambiente com diferentes patógenos, quanto para os indivíduos da mesma espécie remanescentes no ambiente natural, ou de outras espécies animais, que vão estar em contato direto com estas aves.

13. Agradecimentos

Agradeço ao Criadouro Onça Pintada e Gramado Zoo, que ofereceram suporte à coleta de materiais e que se dedicam no cuidado e manejo de animais ameaçados. Às minhas orientadoras Camile Lugarini e Patrícia Serafini pelo conhecimento e suporte oferecido. A toda a equipe da Esec Carijós, sempre receptivos, e que ofereceram estrutura para a realização do trabalho, principalmente ao Claudinei José Rodrigues e Rafael Meurer, técnico de laboratório. Ao ICMBio como um todo, por oportunizar a realização de um projeto de pesquisa e participação na conservação da biodiversidade Nacional. E finalmente, ao CNPq, que incentiva estudantes de graduação a se dedicarem exclusivamente à pesquisa, tornando-nos profissionais mais qualificados.

14. Referências bibliográficas

- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços de saúde. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica.** Brasília, 2004.
- 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: 25 de janeiro de 2016.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes da Conservação. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Passeriformes Ameaçados dos Campos Sulinos e Espinhaço:** Brasília, 2013.
- DIAS, R. A. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, Brasília, DF, Brasil, 536p. 2008. BRASIL. Portaria N° - 444, de 17 de dezembro de 2014. Disponível em: < http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-dorisco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 25 de Janeiro de 2016.
- ECKBURG, P. B. et al. **Diversity of the human intestinal microbial flora:** Science. 308 ed. 2005.
- GIBBS Penelope S. et al. **Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members from the family Enterobacteriaceae from the feces of Yellow-Headed lackbirds (Xanthocephalus xanthocephalus) in North Dakota:** Avian Disease. 2007.
- HEARD Matthew J. et al. **Increased threat of disease as species move towards extinction:** Author Manuscript, Conserv Biol. 27 ed. 2015.
- HIRSH, D.C; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology:** Blackwell Science. Oxford. 1999.
- HOOD, G. M. **PopTools version 3.2.5.** Available on the internet. < <http://www.poptols.org>>
- KOHL K. D. **Diversity and function of the avian gut microbiota:** Journal of Comparative Physiology B, Springer-Verlag, 182 ed. 2012.
- KOSHLAND Jr D.E.. **The biological warfare of the future:** Science, 264 ed. 1994.
- LU, Jiangrang, et al. **Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken:** Applied and Environmental Microbiology, 69 ed. 2003.

MELVILLE P. A. et al. **Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente saudáveis**: Ciência Rural, Volume 34. Santa Maria, 2004.

MENDONÇA-FURTADO, O. **Uso de ferramentas como enriquecimento ambiental para Macacos-prego (*Cebus apella*) cativos**: São Paulo, 2006.

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, 1ªEd. Florianópolis, 2015.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes da Conservação. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, Brasília, DF, Brasil, 536p. 2008. BRASIL. Portaria N° - 444, de 17 de dezembro de 2014. Disponível em:

<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-dorisco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 25 de Janeiro de 2016.

OPLUSTIL, Carmen Paz et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

SANTOS, Tiago et al. **Dissemination of antibiotic resistant Enterococcus spp. and Escherichia coli from wild birds of Azores Archipelago**: Anaerobe 25 ed. Amsterdam, Elsevier, 2013.

SANTOS Helton. Fernandes et al. **Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos**: Pesquisa Veterinária Brasileira, ed. 30. 2010.

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

SMITH, K. F.; BEHRENS, M. D.; SAX D. F. **Local Scale Effects of Disease on Biodiversity**: EcoHealth 6 ed. 2009.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

- XENOULIS, Panagiotis G. et al. **Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots**: Veterinary Microbiology. 146 ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. 602p. Springer-Verlag, 2012.
- WAITE, D.W.; TAYLOR, M.W. **Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function**: Front.Microbiol. 5 ed. 2014.
- WIENEMANN T. et al. **The bacterial microbiota in the ceca of Capercaillie (Tetrao urogallus) differs between wild and captive birds**: Systematic and Applied Microbiology, ed. 34. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- WINN JR, W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2012.