



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

FERNANDA ALDA DA SILVA

**PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO
DE BIOFILME DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DA OROFARINGE DE
Rupornis magnirostris (Gmelin, 1788) E *Caracara plancus* (Miller, 1777)**

Vitória de Santo Antão

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE -
PPGSHMA

FERNANDA ALDA DA SILVA

**PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO
DE BIOFILME DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA OROFARINGE DE
Rupornis magnirostris (Gmelin, 1788) E *Caracara plancus* (Miller, 1777)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente

Orientadores: Prof. Dr. José Eduardo Garcia e Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Peixoto Magalhães

Vitória de Santo Antão
2019

Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

S586p Silva, Fernanda Alda da.
Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos e produção de biofilme de microrganismos isolados da orofaringe de *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) e *Caracara plancus* (Miller, 1777) / Fernanda Alda da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2019.
107 folhas; il.: color.

Orientador: José Eduardo Garcia.
Orientadora: Isabella Macário Ferro Cavalcanti.
Coorientadora: Carolina Peixoto Magalhães
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Gavião-carijó. 2. Histologia animal. 3. Carcará. I. Garcia, Jose Eduardo. (Orientador). II. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro (Orientadora). III. Magalhães, Carolina Peixoto (Coorientadora). IV. Título.

636.089 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-16/2019

FERNANDA ALDA DA SILVA

**PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE BIOFILME
DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA OROFARINGE DE *RUPORNIS MAGNIROSTRIS*
(GMELIN, 1788) E *CARACARA PLANCUS* (MILLER, 1777)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 26/02/2019.

Orientador: Dr. José Eduardo Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Eduardo Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa dissertação a todos os leitores, principalmente a quem virá lê-lo em busca de auxílio, apesar do cansaço saiba que não estás sozinho e se eu consegui, você também irá.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado da colaboração e do esforço de uma equipe que se formou com a ideia de trabalhar com animais silvestres. No decorrer do tempo diversas pessoas abraçaram a ideia e contribuíram imensamente para a realização de todas as etapas, e para o êxito do projeto do qual colhemos diversos frutos. Como em qualquer elaboração de lista, corremos o risco de esquecer alguém importante, desde já peço desculpas pelo eventual esquecimento.

Sou especialmente grata:

A Deus pela força concebida em todas as etapas da minha vida e da minha carreira.

Aos meus orientadores Prof. Dr. José Eduardo Garcia e Profa. Dra. Isabella Macário, pela orientação, por toda a confiança depositada, incentivo e por acolher o projeto dando toda a ajuda necessária para a realização deste trabalho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Carolina Peixoto, que desde o início acreditou no meu potencial e que abriu as portas para meu encaminhamento como profissional.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA) pelo apoio e infraestrutura disponibilizada.

Ao CETAS IBAMA-PE por nos conceder os espécimes e todo o apoio dispensado.

Aos Técnicos do laboratório de Anatomia do CAV, Ewerton, André e meu querido amigo Kléber Fraga que foi essencial para a realização dessa e de tantas outras pesquisas.

À Sandrelli Meridiana pelo apoio e paciência com os experimentos de microbiologia, assim como ao Prof. Reginaldo Golçalves, do Departamento de Micologia (CB/UFPE), e toda sua equipe pela contribuição em nossas análises.

À minha turma da Pós-graduação, pelo convívio e aprendizado, superando dificuldades e obstáculos encontrados graças a uma boa interação e apoio, e por todos os momentos que vivemos durante todo esse tempo.

Por fim agradeço à minha família pelo apoio incondicional às minhas decisões profissionais, além do enorme suporte pessoal durante todo tempo da minha vida.

Aos meus grandes amigos, Rita Reis, Rosana Souza, Rafaela Alves e Sílvia Francisco, pelo apoio nas horas de alegria e dificuldades, por compartilhar momentos únicos que vou levar comigo pelo resto da minha vida.

Ao meu esposo Thiago Santos, pela amizade, companheirismo e apoio em todas as situações, por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava mais. Por me manter em vários momentos onde acreditei não poder mais prosseguir, tenho imensa sorte de ter você ao meu lado como companheiro de vida.

Ao grupo “Bolsistas Capes” do Facebook pelo auxílio de diversas formas durante essa árdua caminhada, desde relatos, materiais e experiências disponibilizados, como companheirismo e momentos de descontração diminuindo o peso durante o dia a dia.

Agradeço carinhosamente a mim, por não ter desistido apesar das dificuldades, por não ter me abandonado, ter crescido e ter tido coragem de me reinventar durante todo esse processo.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, no desenvolvimento deste trabalho ou na minha formação, como pessoa, amigo e profissional.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(CHAPLIN, 1997, p.118)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar e identificar microrganismos com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtores de biofilme na orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*. Inicialmente, foram obtidos seis Gaviões-carijós (*R. magnirostris*) e seis Carcarás (*C. plancus*) do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) – IBAMA, durante o período de março a novembro de 2017. As amostras da orofaringe desses animais foram coletadas utilizando swabs estéreis, os quais foram transferidos para caldos específicos para posterior identificação de *Staphylococcus aureus*, enterobactérias e leveduras. Em seguida, foi realizada a análise do perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos das bactérias e leveduras de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para a avaliação da produção de biofilme pelos microrganismos, as amostras foram submetidas aos testes de vermelho congo (análise qualitativa) e coloração com cristal violeta (análise quantitativa). Das 12 aves analisadas no estudo, 10 delas apresentaram cepas de *S. aureus* e/ou enterobactérias na orofaringe, representadas por todos os espécimes de *R. magnirostris* e 4 *C. plancus*. Foram identificadas 8 cepas de *S. aureus*, das quais 3 foram caracterizadas como *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), 1 *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e 4 *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA). Foram identificadas 25 cepas de enterobactérias, das quais 10 foram representadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e 2 eram *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Quanto a análise dos fungos, 10 leveduras foram identificadas em 7 dos 12 animais. O gênero *Candida* spp. foi predominante, seguido por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon coremiiforme*, *Rhodotorula glutinis* e *Cryptococcus* spp.. Em relação ao perfil de suscetibilidade dessas leveduras, *R. mucilaginosa* apresentou resistência ao fluconazol e sensibilidade à anfotericina B. No entanto, isolados de *T. coremiiforme* apresentaram resistência à anfotericina B e sensibilidade ao fluconazol. *Candida ciferri* e *R. glutinis* apresentaram susceptibilidade dose-dependente ao fluconazol, mas foram suscetíveis à anfotericina B. Considerando a produção de biofilme pelos microrganismos, os resultados do método qualitativo (ágar vermelho congo) foram fiéis aos resultados do método quantitativo (método de coloração de cristal violeta). Dentre os 8 isolados de *S. aureus*, 3 isolados foram produtores de biofilme (2 isolados foram pouco produtores e 1 isolado foi fortemente produtor). Dentre os 27 isolados de enterobactérias, 16 isolados foram produtores de biofilme (4 isolados foram fracamente produtores e 12 isolados foram fortemente produtores). Em relação às leveduras, das 10 leveduras identificadas, 7 foram fracamente produtoras de biofilme e 3 isolados não produziram biofilme. Desta forma, os resultados se mostraram preocupante quanto a presença de cepas bacterianas e leveduras com perfil de resistência e produtoras de biofilme na orofaringe dessas aves de rapina. Assim, fica evidente que são cada vez mais necessários estudos relacionados à avaliação desses microrganismos e sua influência na disseminação de infecções nos centros urbanos.

Palavras-chave: Gavião-carijó. Carcará. Bactérias. Leveduras. Resistência. Biofilme.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify microorganisms with antimicrobial resistance profile and biofilm producers in the oropharynx of *Rupornis magnirostris* and *Caracara plancus*. Initially, six Hawks-carijos (*R. magnirostris*) and six Carcaras (*C. plancus*) were obtained from the Wild Animals Triage Center (CETAS) - IBAMA, during the period from march to november, 2017. The oropharynx samples from these animals were collected using sterile swabs, which were transferred to broths for further identification of *Staphylococcus aureus*, enterobacteria and yeasts. Then, the phenotypic profile of antimicrobial resistance of bacteria and yeasts was analyzed according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). For the evaluation of biofilm production by the microorganisms, the samples were submitted to the red congo (qualitative analysis) and violet crystal staining (quantitative analysis). Among the 12 birds analyzed in the study, 10 presented strains of *S. aureus* and/or enterobacteria in the oropharynx, represented by all specimens of *R. magnirostris* and 4 *C. plancus*. Eight strains of *S. aureus* were identified, which 3 were characterized as methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 1 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and 4 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). Twenty-five strains of enterobacteria were identified, which 10 were represented by enterobacteria extended spectrum β -lactamases (ESBL) and 2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Regarding the fungal analysis, 10 yeasts were identified in 7 of 12 animals. The genus *Candida* spp. was predominant, followed by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon coremiiforme*, *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus* spp.. Concerning the susceptibility profile of these yeasts, *R. mucilaginosa* presented resistance to fluconazole and sensitivity to amphotericin B. However, isolates of *T. coremiiforme* exhibit resistance to amphotericin B and sensitivity to fluconazole. *Candida ciferri* and *R. glutinis* showed dose-dependent susceptibility to fluconazole, but they were susceptible to amphotericin B. Considering the biofilm production by the microorganisms, the results of the qualitative method (red congo agar) were faithful to the results of the quantitative method (violet Crystal staining). Among the 8 *S. aureus* isolates, 3 isolates were biofilm producers (2 isolates were poorly produced and 1 isolate was strongly producer). Among the 27 isolates of enterobacteria, 16 isolates were biofilm producers (4 isolates were poorly producers and 12 isolates were strongly producers). Regarding yeasts, among the 10 yeasts identified, 7 were poorly biofilm producers and 3 isolates were not biofilm producers. Based in this finds, the results were worrisome about the presence of bacterial strains and yeasts with resistance profile and biofilm producers in the oropharynx of these birds of prey. Thus, it is evident that there is a growing need for studies related to the evaluation of these microorganisms and their influence on the spread of infections in urban centers.

Keywords: Hawk-carijo. Carcara. Bacteria. Yeasts. Resistance. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da literatura

Figura 1 - Distribuição geográfica do Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>).....	18
Figura 2 - Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>).....	19
Figura 3 - Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>) predando pombo em área urbana.	20
Figura 4 - Distribuição geográfica do Carcará (<i>Caracara plancus</i>).....	20
Figura 5 - Carcará (<i>Caracara plancus</i>).....	21
Figura 6 - Carcará (<i>Caracara plancus</i>) predando uma serpente	22
Figura 7 - Formação do biofilme. 1: Células bacterianas individuais colonizam uma superfície. 2: A substância polimérica extracelular (EPS) é produzida e torna-se irreversível. 3 e 4: A arquitetura do biofilme se desenvolve e amadurece. 5: Células planctônicas únicas (planctônicas - significando flutuação livre) são liberadas do biofilme.....	28

Artigo 2

Figura 1: Identificação da produção de biofilme em microrganismos isolados da orofaringe de <i>Rupornis magnirostris</i> e <i>Caracara plancus</i> pelo método de vermelho congo.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIACOES

CB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comissão de <i>tica</i> no Uso de Animais
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EPS	Exopolissacardeo
ESBL	Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservao da Biodiversidade
IUCN	União Internacional para Conservao da Natureza
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de orofaringe de <i>Rupornis magnirostris</i> e <i>Caracara plancus</i>	47
Tabela 2: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de orofaringe de <i>Rupornis magnirostris</i> e <i>Caracara plancus</i>	50
Tabela 3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de leveduras isoladas de orofaringe de <i>Rupornis magnirostris</i> e <i>Caracara plancus</i>	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Características gerais das aves de	17
3.2 Características gerais do Gavião-carijó e do Carcará	18
3.3 Identificação de microrganismos em aves	22
3.4 Identificação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em aves	24
3.5 Microrganismos formadores de biofilme	26
4 ARTIGO 1 - DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM AVES.....	29
5 ARTIGO 2 - PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA OROFARINGE DE RUPORNIS MAGNIROSTRIS (GMELIN, 1788) E CARACARA PLANCUS (MILLER, 1777).....	39
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	91
ANEXO B – NORMAS DA APPROACHES IN POULTRY, DAIRY & VETERINARY SCIENCES	92
ANEXO C – NORMAS DA APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.....	96
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	105

1 INTRODUÇÃO

O Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) e o Carcará (*Caracara plancus*) pertencem às ordens Falconiformes e Accipitriformes, respectivamente. Essas aves são representantes de duas das quatro ordens que constituem o grupo polifilético das aves de rapina. O Gavião-carijó encontra-se distribuído na Argentina, Bolívia e em muitos estados do Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai. Carcará ocorre desde o México até a Argentina (IUCN, 2016). Gavião-carijó e Carcará habitam diferentes tipos de ambientes incluindo áreas urbanas, além de frequentar beiras de estradas, bordas de matas e pastagens a procura de alimento. Essas aves de rapina possuem importante papel ecológico de controle das populações de pequenos animais, sendo consideradas predadoras de topo de cadeias e teias alimentares, ajudando a manter estável o equilíbrio ecológico do ecossistema em que vivem (AZEVEDO et al., 2003; TINAJERO et al., 2017).

As aves de rapina são consideradas bioindicadoras de qualidade ambiental, devido ao seu papel ecológico, porém, elas também são afetadas pelas alterações das condições ambientais, podendo ser indicadoras da conservação do habitat no qual estão inseridas. Além disso, algumas espécies podem se adaptar a ambientes antropizados, como é o caso do *Rupornis magnirostris* e do *Caracara plancus*, sendo assim expostos a uma grande variedade de compostos físicos, químicos e biológicos presentes nesse ambiente (SICK, 1997; FERGUSON-LEES; CHRISTIE, 2001; ANDREAZZI et al., 2016; SILVA, 2017; TINAJERO et al., 2017; BERGLUND, 2018).

Aves de rapina de vida livre, assim como outros grupos de aves, podem ser consideradas reservatórios ou mesmo vetores de patógenos, pois vários estudos demonstram que essas aves ficam expostas aos microrganismos pelo contato com resíduos e escoamento de granjas ou pela ingestão de carcaças contaminadas (SELLIN et al., 2000; HÖFLE et al., 2002; DROBNI et al., 2009; LONCARIC et al., 2013; PORRERO et al., 2013; ANDREAZZI et al., 2016).

O contato dessas aves com as áreas antropizadas aumenta também a exposição desses animais aos microrganismos resistentes aos antimicrobianos. O grupo de pesquisa desse trabalho já identificou enterobactérias com perfil de resistência presentes na cloaca de Gaviões-carijó (*Rupornis magnirostris*), entre

eles, *E. coli* resistente à ampicilina, cefalotina e ciprofloxacina, *K. pneumoniae* resistente à ciprofloxacina, ceftriaxona e imipenem, além de *Salmonella* spp. com resistência simultânea à ampicilina e cefalotina (SILVA et al., 2016). Os estudos sobre o perfil de resistência em microrganismos provenientes de aves silvestres ainda são escassos, mas se mostram cada vez mais crescentes, pois esses animais além de serem acometidos por infecções geradas por esses microrganismos, assumindo um papel de agente bioindicador, podem se tornar reservatórios e potenciais disseminadores desses agentes devido a sua capacidade migratória (BONNEDAHL, 2014; SILVA et al., 2018).

Além da possível colonização dessas aves por microrganismos com perfil de resistência aos antimicrobianos, esses agentes infecciosos também podem ser produtores de fatores de virulência que aumentam a capacidade desses microrganismos de provocar infecções. Um dos principais fatores de virulência é o biofilme (HERNÁNDEZ-FILLOR, 2017). Um biofilme consiste em um grupo de células sésseis, mono ou multiespécies, podendo ser de origem bacteriana ou fúngica, que estão aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e cercadas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS). Os microrganismos em biofilme expressam diferentes tipos de fisiologia, metabolismo, fenótipos e transcrição genética (SAUER, 2003; CHAKRABORTY et al., 2018). A estrutura física do biofilme pode explicar a cronicidade ou recorrência de infecções, pois as bactérias em um biofilme tendem a ser mais resistentes a agentes antimicrobianos e conseqüentemente exigem maiores concentrações desses agentes para inibir sua formação ou erradicá-los (KLINGER-STROBEL et al., 2015; HALL; MAH, 2017; LI et al., 2017).

Uma vez que dados referentes à identificação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e produtores de biofilme em aves de rapina são escassos, esse estudo se propõe a identificar esses patógenos. Dessa forma, pretende-se preencher essa lacuna na área científica e contribuir com a saúde pública, já que essas espécies estão presentes em ambientes antropizados e podem se tornar disseminadores desses patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar bactérias e leveduras da orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus* e verificar seu perfil de resistência aos antimicrobianos e a produção de biofilme.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* e leveduras da orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*;
- Verificar o perfil de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos;
- Identificar e quantificar a produção de biofilme pelos microrganismos isolados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais das aves de

As aves de rapina são um agrupamento polifilético, pois as ordens que as compõem possuem linhagens evolutivas distintas, dentre elas Falconiformes (falcões e caracará), Accipitriformes (águias e gaviões), Strigiformes (corujas) e Cathartiformes (urubus). A inclusão da ordem Cathartiformes foi por muito tempo questão de discussão entre especialistas, porém estudos mais recentes que levam em conta características morfológicas e compartilhamento de genes indicam que os urubus compõem um grupo singular, tendo semelhanças com águias e gaviões da ordem Accipitriformes (BRITO, 2008; HACKETT et al., 2008; MENQ, 2016).

Essas aves compartilham, em sua maioria, características e adaptações para caça e captura de presas, por isso são denominadas aves de “rapina” ou rapinantes, já que pela etimologia, o termo tem origem no latim e significa “raptar” (aquele que pega e leva consigo). Assim, as aves de rapina são consideradas carnívoras adaptadas para caça ativa, tanto de organismos vertebrados quanto invertebrados (FERGUSON-LESS; CHRISTIE, 2001).

As adaptações morfológicas das aves de rapina são garras e tarsos fortes bem desenvolvidos, que variam de acordo com o tipo de presa predada. Esses animais possuem bico bem desenvolvido, afiado e podem apresentar especializações, como o caso do gavião-caramujeiro (*Rostrhamus sociabilis*) cujo bico é longo e curvo, adaptado para retirar os caramujos do interior das conchas (MENQ, 2016). Além disso, a audição e a visão são bem desenvolvidas, sendo a visão tão relevante que essas aves possuem frontalização das órbitas, o que proporciona grande noção de distância e profundidade, facilitando a localização da presa e sua captura durante a caça (BROWN, 1997; FERGUSON-LESS; CHRISTIE, 2001; MENQ, 2016; SILVA, 2016).

As aves de rapina são consideradas indicadoras de qualidade ambiental, devido ao seu destaque como predadoras de topo em cadeias e teias alimentares. Algumas espécies podem se adaptar a ambientes antropizados como é o caso do

Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) e o Carcará (*Caracara plancus*) (FERGUSON-LEES; CHRISTIE, 2001; AZEVEDO et al., 2003).

Figura 1 - Distribuição geográfica do Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*).



Fonte: IUCNRedlist.

3.2 Características gerais do Gavião-carijó e do Carcará

O Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) é uma ave de rapina pertencente ao filo Chordata, classe Aves, ordem Accipitriformes, família Accipitridae. Essa ave é encontrada na América Latina, desde o México até a Argentina, sendo o gavião mais abundante no Brasil, distribuindo-se por todo o país (Figura 1) (SICK, 1997).

Possui tamanho médio de 36 cm e pesa entre 200 g e 400 g, apresentando variação da coloração da plumagem de acordo com a região do país, destacando-se faixas claras na região do peito que contrastam com o restante da coloração, o que lhe confere o nome popular: Gavião-carijó (Figura 2) (ANTAS, 2004; CURCINO et al., 2009; GRANZINOLLI, 2009; TORTATO, 2009). Esse animal é bastante territorialista e habita vários tipos de ambientes como, por exemplo, bordas de matas, campos e pastagens (SICK, 1997; FERGUSON-LESS; CHRISTIE, 2001; PIRATELLI et al., 2005; TORTATO, 2009), podendo ainda ser encontrado em áreas costeiras e nos Andes, em locais com altitude maior que 3000 m (TORTATO, 2009), sendo uma espécie bastante comum e bem adaptada às ações antrópicas. O

Gavião-carijó é facilmente encontrada habitando os centros urbanos, considerado um gavião com grande capacidade adaptativa quanto aos habitats (CURCINO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; TORTATO, 2009; LEVEAU; ISLA; BELLOCQ, 2015).

Figura 2 - Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*).



Fonte: <http://bonitobirdwatching.blogspot.com.br>

Essa espécie foi citada por diversos autores como pertencente ao gênero *Buteo* (PINTO; VICENTE; NORONHA, 1994; AZEVEDO; MACHADO; ALBUQUERQUE, 2003; LUNASCHI; DRAGO, 2006; MELO et al., 2013), porém após estudos moleculares percebeu-se que o Gavião-carijó é o representante mais antigo do gênero, *Buteo*, optando então por ganhar um gênero próprio denominado *Rupornis* (RIESING et al., 2003; LERNER; KLAVER; MINDELL, 2008), passando a ser chamado *Rupornis magnirostris*.

Essa ave possui hábito alimentar generalista e oportunista, com a alimentação consistindo principalmente de artrópodes, pequenos lagartos, cobras, pássaros, roedores e em certas ocasiões capturam morcegos em seus pousos diurnos (Figura 3) (SICK, 1997; TORTATO, 2009), desenvolvendo papel importante na cadeia alimentar por ser um predador de topo. O Gavião-carijó contribui para o controle populacional de pequenos roedores, além de importante papel ecológico, por ser predador de topo, sendo responsável pela manutenção e funcionamento de comunidades as quais pertencem (RICKLEFS; MILLER, 2000; TORTATO, 2009, SILVA et al., 2016).

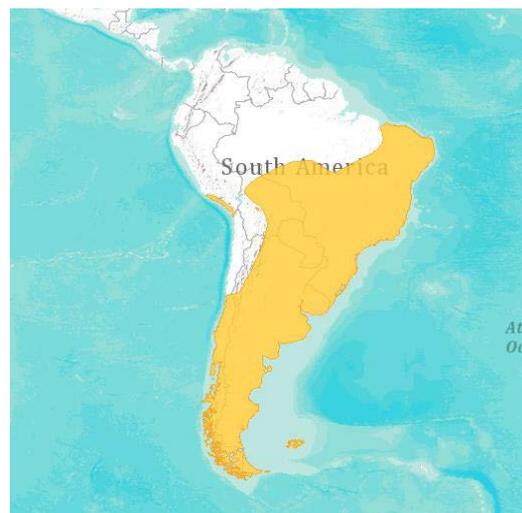
Figura 3 - Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) predando pombo em área urbana.



Fonte: <http://www.jornalacidade.com.br>

O Carcará, pertence ao filo Chordata, classe Aves, ordem Falconiformes, família Falconidae, gênero *Caracara* e espécie *Caracara plancus*.

Figura 4 - Distribuição geográfica do Carcará (*Caracara plancus*).



Fonte: IUCNRedlist.

Essa ave está distribuída na Argentina, Bolívia, Chile, Peru, Uruguai e em muitos estados do território brasileiro (Figura 4) (IUCN, 2017).

Pesa cerca de 1 kg e possui aproximadamente 120 a 130 cm de envergadura. Sua coloração é predominantemente parda, realçada por um penacho de penas negras na cabeça, característica marcante da espécie (Figura 5) (FRANZO et al., 2009; MCKINNEY, 2009). O Carcará é uma ave de rapina campestre, que habita campos abertos, cerrados, beiras de estradas a procura de alimento, incluindo também centros urbanos (FRANZO et al., 2009).



Fonte: http://www.avesderapinabrasil.com/caracara_plancus

O Carcará é uma ave onívora, considerada tipicamente generalista e oportunista devido a sua grande diversidade alimentar, constituída desde frutos, anelídeos, anfíbios, répteis, ovos, aves vivas, a detritos, cadáveres e matéria orgânica em decomposição (Figura 6) (SICK, 1997; SICK, 2001). Existem relatos da importância dessa espécie como dispersor de sementes, já que ao se alimentar de frutos ele só consome sua polpa deixando a semente intacta. Esse animal é de grande importância ecológica por fazer parte de diversas cadeias alimentares (GALETTI; GUIMARÃES JUNIOR, 2004; VILLALOBOS; BAGNO, 2013). Devido a sua grande diversidade alimentar, o Caracara também é considerado uma espécie que se adapta bem a áreas antropizadas. Além da sua presença já ter sido relatada em áreas urbanas, também foi descrito seu processo de nidificação em estruturas humanas de Buenos Aires na Argentina. Apesar dessa proximidade com áreas urbanas os dados na literatura relacionados ao Carcará são escassos, se concentrando em estudos voltados aos aspectos da sua biologia reprodutiva (SEIPKE, 2012), sua morfologia e biometria (FRANZO et al., 2009; FRANZO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2016), além de distribuição geográfica, alimentação e ecologia (AZEVEDO; MACHADO; ALBUQUERQUE, 2003; GONZÁLEZ-ACUÑA et al., 2008; MCKINNEY, 2009). Estudos sobre análises clínicas e infecções em aves são ainda mais escassos, podendo destacar um estudo referente à infecção pelo parasita *Hemoproteus* spp. e infecção experimental com *Toxoplasma gondii* simulando condições naturais (VITALIANO et al., 2010; TOSTES et al., 2015).



Fonte: <https://www.wikiaves.com.br/carcara>

As duas espécies de aves possuem grande capacidade adaptativa em ambientes urbanos, o que aumenta também seu contato com microrganismos diversos, incluindo os patógenos de interesse à saúde pública. Casos de bactérias com resistência aos antimicrobianos em aves aumentam com a proximidade desses animais aos humanos. Assim, as aves podem se tornar reservatórios e possíveis disseminadores desses microrganismos através da migração (ALLEN et al., 2010).

3.3 Identificação de microrganismos em aves

As aves podem ser acometidas por uma grande variedade de doenças, dentre elas as infecções causadas por bactérias, fungos, vírus ou parasitas. As bactérias patogênicas afetam diversas espécies de aves, sendo identificadas com maior frequência em animais domésticos ou de produção, porém estudos recentes revelam que a suscetibilidade a doenças bacterianas também está presente em aves silvestres (DIPINETO et al., 2015; VIDAL et al., 2017; GARGIULO et al., 2018). Dentre as bactérias gram positivas que infectam aves destaca-se *Staphylococcus aureus*, considerado causador de diversas patologias humanas como infecções epiteliais, como furúnculos e pústulas, além de osteomielite, mastite, meningite, pneumonia, síndrome coronariana e septicemia (CHEESBROUGH, 2006; UMARU et al., 2011).

Dentre as bactérias gram negativas que podem infectar aves destaca-se a família *Enterobacteriaceae*, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. Uma vez presente nas aves, essas bactérias podem infectar humanos devido à presença desses animais em ambientes antropizados. Em seres humanos, essas bactérias podem ser responsáveis por gastroenterites, doenças respiratórias, septicemia e até mortalidade (GUERRERO et al., 2014; MATIAS et al., 2016; COSTA-JUNIOR et al., 2018).

A identificação de microrganismos com potenciais de patogenicidade em aves, principalmente silvestres e migratórias, é de suma importância para o monitoramento de focos naturais de zoonoses (GOMES et al., 2015). Estudos com espécies do gênero *Salmonella* destacam a presença desses microrganismos em aves silvestres e ressaltam que esses animais podem ser contaminados através do meio que circulam (TIZARD, 2004; GOMES et al., 2015).

Os hábitos alimentares desses animais também acabam por se tornar uma forma de contaminação. Nas aves carnívoras e onívoras, a salmonelose ocorre principalmente através do consumo de presas infectadas (TIZARD, 2004). Estudos com aves de rapina identificaram múltiplos sorotipos de *Salmonella* indicando uma ampla fonte de contaminação, pois essas aves se alimentam de vários organismos, como pequenas aves e mamíferos (RECHE et al., 2003; TIZARD, 2004; DIPINETO et al., 2015).

Fungos também são patógenos conhecidos que podem contaminar aves de vida livre e cativeiro, e quando migratórias também podem atuar como possíveis reservatórios e disseminadores desses agentes. Estudos como o de Lord e colaboradores (2010) identificaram diversas espécies de leveduras em amostras provenientes de aves selvagens, entre elas diversas espécies de *Candida*, como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, e *Candida glabrata*, além de *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus uniguttulatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon pullulans*, *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis*. Essas espécies fúngicas possuem potencial zoonótico e podem causar doenças como candidíase, infecções cutâneas e oculares, e problemas mais graves em pacientes imunodeprimidos, como meningite e infecção pulmonar (LANZAFAME et al., 2001; HOLLAND; SHEA; KWON-CHUNG, 2004).

Estudos relatam a identificação de fungos de interesse para a saúde pública em aves, como espécies o gênero *Cryptococcus*. Costa e colaboradores (2010) identificaram exemplares de *Cryptococcus* em amostras fecais de pombos, especificamente *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii*, mesmas espécies isoladas por Cafarchia e colaboradores (2006) em amostras provenientes da cloaca de aves de rapina. *Cryptococcus neoformans* é um patógeno conhecido por sua capacidade de colonizar a mucosa do papo de pombos se comportando como endossaprófito natural, não causando doença no hospedeiro. Porém a grande adaptação dos pombos a centros urbanos facilita a dispersão desse patógeno no ambiente, já que essa levedura pode permanecer viável por dois anos ou mais nas fezes depositadas por essas aves. Em humanos essa levedura é capaz de provocar graves quadros clínicos, inclusive a meningite, levando muitos pacientes a óbito (TORRES; D'APARECIDA; HAAS, 2015).

3.4 Identificação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em aves

Vários estudos indicam que além de serem agentes patogênicos, vários microrganismos podem apresentar resistência a antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos é definida como a capacidade que alguns microrganismos possuem de não serem afetados pelos antimicrobianos (OMS, 2018). A resistência bacteriana em aves aumenta com a proximidade desses animais a humanos, e as aves migratórias e aquáticas, em particular, podem espalhar os genes de resistência através dos trajetos que percorrem (ALLEN et al., 2010). As aves podem ser infectadas por microrganismos resistentes através de alimentação e meio ambiente contaminados, uso de antimicrobianos e contato com o homem e outros animais (HÖFLE et al., 2002; BONNEDAHL; JÄRHULT, 2014; MATIAS et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Aves selvagens são relevantes bioindicadores em relação à resistência a antimicrobianos, sendo reflexo do impacto humano no meio ambiente. Essas aves podem atuar ainda como reservatórios de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, tornando-se assim agentes propagadores desses microrganismos através da capacidade de migração das aves (BONNEDAHL; JÄRHULT, 2014).

O uso indiscriminado de antimicrobianos contribui com o aumento de bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR), como por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) contribuindo para o surgimento de novas infecções (HARDLEY, 2014; HENRY et al., 2017).

Na década de 1960 foi desenvolvido um antibiótico do grupo das penicilinas denominado meticilina que não era susceptível à ação da β -lactamase, sendo a primeira penicilina semi-sintética em uso clínico, porém no início da década seguinte surgiram cepas de MRSA (SANTOS et al., 2007; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015). Infecções causadas por cepas de MRSA foram consideradas um problema restrito a área hospitalar durante a década de 1980, porém na mesma década houve o surgimento de cepas com características genéticas e fenotípicas distintas que geravam infecções em pessoas saudáveis e não expostas aos fatores de risco, denominadas cepas de origem comunitária ou CA-MRSA (Community-Acquired) (BASSETTI; NICCO; MIKULSKA, 2009; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015). Infecções causadas por MRSA são emergentes e preocupantes devido ao aumento na prevalência nos últimos anos e por seu grande potencial em evoluir para casos graves e óbito (HIDRON et al., 2009; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015).

Para combater infecções causadas por cepas de MRSA foi proposta a utilização de um glicopeptídeo conhecido desde 1956, a vancomicina, porém já em 1997 foi descrita no Japão uma cepa de VRSA (WALSH; HOWE, 2002; SANTOS et al., 2007). A maioria dos isolados de VRSA parece ter se desenvolvido após infecções por MRSA, o que ressalta a urgência da descoberta ou síntese de novos antibióticos para tratamentos de cepas de *S. aureus* multirresistentes (TIWARI; SEM, 2006; SANTOS et al., 2007; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015).

O primeiro relato de microrganismos produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi em 1983 e desde então esses microrganismos têm sido descritos em todo o mundo (PATERSON; BONOMO, 2005; ARNOLD et al., 2011). Essas enzimas são capazes de hidrolisar fármacos e conferir resistência bacteriana as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam, mas não as cefamicinas ou carbapenems (PATERSON; BONOMO, 2005;

NOGUEIRA-MIRANDA et al., 2012). Alguns estudos relatam que a falta de identificação dessa resistência e o uso de terapias não adequadas são as principais causas de mortalidade em pacientes com infecções causadas por esses patógenos (TUMBARELLO et al., 2010; NOGUEIRA-MIRANDA et al., 2012).

A enzima carbapenemase foi identificada primeiramente em 2001 na Carolina do Norte, EUA, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, sendo então denominada de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (ARNOLD et al., 2011). Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) divulgaram em 2009 um relatório sobre as bactérias produtoras de KPC propondo o termo *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos (CRE) como mais adequado, devido às múltiplas espécies de bactérias gram-negativas que podem abrigar esse elemento de resistência, embora *Klebsiella pneumoniae* continue a ser a espécie com maior prevalência de KPCs (KITCHEL et al., 2009; LLEDO et al., 2009; ARNOLD et al., 2011). O fenótipo KPC se tornou uma emergente preocupação da saúde pública devido a sua rápida disseminação pelo mundo. Dessa forma, a detecção desses microrganismos é de interesse para fins epidemiológicos com a finalidade de limitar sua disseminação (TSAKRIS et al., 2009).

3.5 Microrganismos formadores de biofilme

Biofilme é uma estrutura formada por microrganismos que vivem em comunidades, onde os organismos se ligam a uma superfície biótica ou abiótica e permanecem rodeados por uma matriz extracelular autoformada, geralmente um polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS) (COSTERTON et al., 1987; SAUER, 2003; HERNÁNDEZ-FILLOR, 2017; CHAKRABORTY et al., 2018).

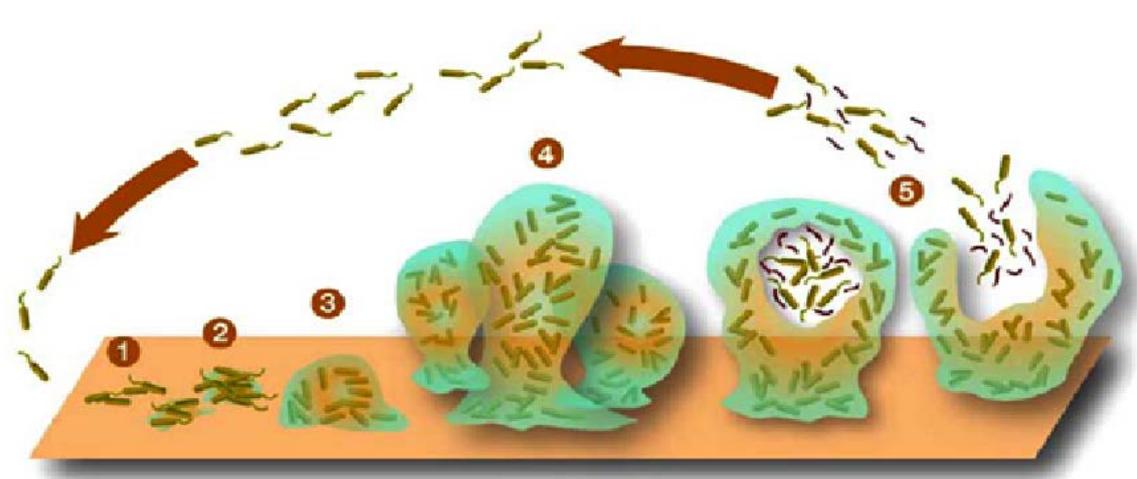
O biofilme é considerado um fator de virulência, pois a estrutura contribui para a resistência aos antimicrobianos, sendo sua formação considerada uma adaptação antiga compartilhada por várias espécies de bactérias, archaea e fungos (OTTO, 2014; SOLANO et al., 2014; PASCOE et al., 2015; HALL; MAH, 2017; LI et al., 2017). Os biofilmes são estruturas complexas e dinâmicas que protegem e mantêm a sobrevivência dos microrganismos tanto em ambientes desfavoráveis, quanto a dessecação, ataque do sistema imunológico, protozoários e contra antimicrobianos, podendo contribuir também no processo de dispersão de patógenos (SOLANO et al., 2014; PASCOE et al., 2015).

O processo de formação do biofilme necessita de interação gênica e ambiental, e possui algumas etapas, dentre elas a adesão inicial, seguida da passagem do microrganismo da forma planctônica para a sésil, formação de microcolônias, maturação e destacamento das células para a colonização de outro sítio; a etapa de adesão pode ser ainda categorizada como um processo de dois estágios: fixação inicial reversível e fixação irreversível, onde o biofilme fixado irreversivelmente suporta forças de cisalhamento físicas ou químicas mais fortes (Figura 7) (ANDRADE BOARI et al., 2009; RENNER; WEIBEL, 2011; PASCOE et al., 2015). A dispersão dos microrganismos que compõem o biofilme é um processo essencial, pois é através dele que os microrganismos podem se desprender e colonizar outros locais quando os recursos e nutrientes no complexo biofilme se tornam escassos, ou quando há um grande acúmulo de resíduos (SOLANO et al., 2014).

Além das estruturas mais comuns identificamos também nos biofilmes a formação de microcanais internos que contribuem para distribuição de água, nutrientes, metabólitos diversos e moléculas sinalizadoras chamado de *quorum sensing* (QS) (BOARI et al., 2009). O *quorum sensing* (QS) também é visto como uma espécie de sistema de comunicação entre células microbianas, sejam elas da mesma espécie ou não, onde os sinais químicos transmitidos são semelhantes a hormônios secretados e sintetizados pelos próprios microrganismos (BOYEN et al., 2009).

A primeira observação de biofilme vem do ano de 1933 em sistemas aquáticos, porém estudos concentrados sobre o tema vêm sendo realizados a pouco tempo onde descobrimos informações importantes sobre a base genética do desenvolvimento do biofilme (O'TOOLE et al., 2000). Compreender sobre os mecanismos da formação do biofilme assim como o QS através de informações moleculares contribuem para o desenvolvimento de métodos mais eficazes para o controle e a interrupção da adesão bacteriana e sua função como agente de resistência em microrganismos (STEENACKERS et al., 2012).

Figura 7 - Formação do biofilme. 1: Células bacterianas individuais colonizam uma superfície. 2: A substância polimérica extracelular (EPS) é produzida e torna-se irreversível. 3 e 4: A arquitetura do biofilme se desenvolve e amadurece. 5: Células planctônicas únicas (planctônicas - significando flutuação livre) são liberadas do biofilme.



Fonte: <http://www.advancedhealing.com/biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>

A identificação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e seus fatores de virulência como a capacidade de formação de biofilme em aves ainda é escassa. Estudos relatam a importância das relações de disseminação e contaminação de antimicrobianos resistentes entre humanos e animais, assim como o interesse no controle de zoonoses de interesse na saúde pública (TIZARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2011; PERCIVAL et al., 2011; SWETHA et al., 2017; CHAKRABORTY et al., 2018).

O contato entre as aves e humanos, principalmente aves de interesse econômico como frangos de corte, aumenta a possibilidade de contaminação desses animais por microrganismos patogênicos. O próprio ambiente compartilhado por ambos pode ser uma via de contato com os agentes patogênicos, alertando para casos de contaminações ambientais causadas por ações antrópicas, como a poluição e descarte inadequado de poluentes, podendo afetar também espécies silvestres (PERCIVAL et al., 2011; SWETHA et al., 2017; CHAKRABORTY et al., 2018). Assim, estudos relacionados a essa temática são de suma importância para preencher essa lacuna na área científica, tanto na medicina humana como veterinária, e contribuir como um alerta em saúde pública.

4 ARTIGO I

DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM AVES

(Mini review publicado pelo periódico *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*)

Disseminação de bactérias multirresistentes em aves

Fernanda Alda da Silva¹, Sarah Brandão Palácio², José Eduardo Garcia³, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{1,2*}

¹Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV), Brazil

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

³Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV), Brazil

*Autor correspondente

Profa. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-81-21268587; fax: +55-81-21268485

E-mail: isabella.cavalcanti@ufpe.br

Resumo

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido uma fonte crescente de preocupação nos últimos anos. O uso indiscriminado e diversificado de antimicrobianos, desde saúde humana, animal e agricultura, contribui para esse quadro. Uma diversidade de organismos contaminados por esses microorganismos é identificada, incluindo aves selvagens e cativas. Devido à capacidade das aves de atingir longas distâncias através do voo, especialmente aves silvestres, elas podem se tornar disseminadoras de agentes com perfil de resistência, além de serem consideradas reservatórios de genes de resistência. Estudos importantes estão relacionados ao grau de contaminação desses animais com microorganismos resistentes, assim como seu potencial como vetores desses agentes.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, Antimicrobianos, Aves, Disseminação.

Introdução

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária, bem como na agricultura, e são uma área de discussão e análise [1-5]. O aumento de microrganismos resistentes ou resistentes a múltiplas drogas é uma consequência inevitável do uso extensivo dos agentes antimicrobianos [1,6-10]. Embora o desenvolvimento de resistência bacteriana seja um evento natural no processo evolutivo de microrganismos, o uso irracional de fármacos antibacterianos em humanos e animais acelerou esse processo [11,12]. Além disso, a alta frequência de viagens humanas e comércio global também contribui para a rápida disseminação mundial de microrganismos resistentes [13].

A resistência antimicrobiana é um problema complexo e multifacetado que envolve seres humanos e animais, assim como o meio ambiente, uma vez que microrganismos resistentes também foram identificados contaminando o solo, alimentos e ambientes aquáticos, o que aumenta a chance de disseminação desses patógenos [14].

Nesse contexto, a resistência antimicrobiana pode afetar animais e seres humanos por meio do contato direto ou indireto com os agentes infecciosos. Aves, domésticas ou selvagens, podem estar contaminadas/infectadas por bactérias resistentes. Essas aves são conhecidas por serem suscetíveis a vários patógenos bacterianos comuns aos seres humanos e outros animais domésticos, tornando-os um agente disseminador do patógeno [15].

O estudo pioneiro que relata a resistência antimicrobiana em animais silvestres revelou isolados de *E. coli* com resistência ao cloranfenicol obtidos de aves silvestres japonesas [16]. Além disso, outros estudos investigaram a ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos em animais de diferentes áreas geográficas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) [17,18], *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina. [19,20], *Salmonella* spp. [21], *Vibrio cholerae* [22] e *Campylobacter* spp. [23] A relevância desses achados deve ser destacada, uma vez que animais silvestres não tendem a ser diretamente expostos a antibióticos. Por estas razões, mais estudos sobre a presença de microrganismos resistentes em aves domésticas e silvestres são necessários.

Resistência bacteriana em aves de cativeiro

Estudos com foco na identificação de bactérias resistentes em aves de abatedouros, como frangos de corte e aves de capoeira, estão crescendo devido ao grande interesse econômico associado a elas. Silva et al. [24] identificaram as enterobactérias presentes em Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) mantidos em cativeiro em Pernambuco, Brasil, e sua suscetibilidade a antimicrobianos. Neste estudo, bactérias de cepas resistentes, como *E. coli* resistentes à ampicilina, cefalotina e ciprofloxacina, *K. pneumoniae* resistentes à ciprofloxacina, ceftriaxona e imipenem, e *Salmonella* spp. com resistência a ambas ampicilina e cefalotina.

Borges et al. [25] investigaram o perfil de resistência a antibióticos em *Salmonella* spp. isolados de aviários e humanos em fazendas de frangos e abatedouros no nordeste da Argélia. Neste estudo, 51,11% e 26,6% dos isolados de aves foram resistentes a ciprofloxacina e cefotaxima, respectivamente, enquanto cepas de *Salmonella* spp. isolados de humanos foram menos resistentes a esses antibióticos (13,5% para ciprofloxacina e 16,2% para cefotaxima). Um dos achados mais alarmantes foi a detecção de dezoito cepas de *Salmonella* spp produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBLs) (12 aves e 6 humanos).

Resistência bacteriana em aves silvestres

Aves selvagens também foram estudadas para o isolamento de cepas bacterianas com resistência antimicrobiana. Mohsin et al. [26] identificaram *E. coli* multirresistente (MDR) em aves selvagens no Paquistão. Estes isolados foram resistentes à cefotaxima, ceftazidima, ampicilina, doxiciclina, tetraciclina e sulfametoxazol / trimetoprima (CTX-CAZ-AM-DC-TE-SXT), representando o padrão mais comum de MDR (76,9%). Shobrak et al. [14] também identificaram o perfil de resistência de isolados de *E. coli* e *Escherichia vulgaris* em aves selvagens migratórias e não-migratórias nas províncias da Arábia Saudita. Foi relatado que todos os isolados de aves não migratórias eram resistentes à oxacilina, enquanto em aves migratórias todos apresentavam resistência à oxacilina, cloranfenicol, oxitetraciclina e lincomicina (MDR).

Estudos de resistência antimicrobiana em isolados de aves silvestres são relevantes, uma vez que estes animais, que ocupam vários nichos ecológicos, podem desempenhar um papel importante como bioindicadores, podendo adquirir

microorganismos de origem humana ou ambiental, refletindo a atividade humana e seu impacto sobre o meio ambiente. Além disso, essas aves podem se tornar reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos e potenciais disseminadores dessa resistência devido à sua grande capacidade migratória em um curto período de tempo [27].

Estudos que evidenciaram essa relação entre resistência antimicrobiana e aves silvestres migratórias identificaram perfil de resistência em aves de locais remotos. Santos et al. [28] identificaram perfis de resistência em *Enterococcus* spp. e *E. coli* de aves silvestres no arquipélago dos Açores, no Oceano Atlântico Norte. Outro estudo identificou a presença de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina. (VRE) no Alasca em gaivotas glaucosas (*Larus hyperboreus*), uma ave migratória limitada, que indica que as bactérias resistentes aos antimicrobianos já se espalharam para uma das áreas mais remotas da América [19].

Apesar dessas identificações em áreas remotas, alguns estudos indicam que os níveis de resistência parecem se correlacionar com o grau de atividades humanas [29,30]. Um estudo realizado no Chile mostrou que a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL entre as gaivotas Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) é duas vezes maior do que em amostras humanas na mesma área. Gaivotas e seres humanos também foram identificados compartilhando tipos específicos de sequências genéticas encontradas em bactérias resistentes aos antimicrobianos, que indicam a transmissão. No entanto, as gaivotas também compartilham sequências de genes com amostras clínicas de bactérias patogênicas humanas do centro do Canadá, um local de nidificação de gaivotas, sugerindo que a migração poderia ser um mecanismo de disseminação da resistência bacteriana [31].

Conclusão

Antimicrobianos são essenciais para a saúde humana, assim como para a saúde animal, mas não devem ser usados de maneira irracional. As aves são afetadas por microorganismos resistentes aos antimicrobianos, incluindo cepas com sequências compartilhadas com humanos, indicando o potencial de transmissão entre elas. As aves selvagens não entram naturalmente em contato com antibióticos, mas também podem ser colonizadas por microorganismos resistentes. Há evidências de que, no caso de aves silvestres, essa transmissão pode ocorrer a partir de fontes

de contaminação ambiental, geralmente causadas por negligência humana. Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos em hospitais e fazendas, por exemplo, resíduos contendo antimicrobianos e genes de resistência são descartados no meio ambiente e podem afetar animais silvestres. Além disso, a disseminação de microrganismos de resistência antimicrobiana pode ocorrer através da migração de aves silvestres, tornando estes animais um reservatório de genes de resistência. O uso racional de antimicrobianos é de suma importância e deve ser baseado na identificação de agentes infecciosos e sua susceptibilidade antimicrobiana, além da administração desses medicamentos em doses corretas pelo tempo correto. O correto diagnóstico e prescrição de antimicrobianos deve ser alcançado por meio da educação continuada de médicos veterinários e médicos, esclarecendo a população sobre a real indicação desses medicamentos.

Agradecimentos

F. A. Silva agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Referências

1. Beovic B (2006) The issue of antimicrobial resistance in human medicine. *Int J Food Microbiol* 112(3): 280-287.
2. Martinez JL (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157(11): 2893-2902.
3. Vieira PN, Vieira SLV (2018) Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 21(3): 209-212.
4. Lima MFP, Borges MA, Parente RS, Victória Júnior RC, Oliveira ME (2018) *Staphylococcus aureus* e as Infecções Hospitalares - Revisão de Literatura. *Revista Uningá Review* 21(1): 32-39.
5. Arenas NE, Melo VM (2018) Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio* 22(2): 110-119.
6. Mateu E, Martin M (2001) Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48(8): 569-581.

7. Aiello G, Battaglia L, Bahr Arias MV, Freitas J (2007) Determinação dos índices de infecção hospitalar em um centro cirúrgico universitário veterinário de pequenos animais. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(1): 354-356.
8. Carrilho CMD de M, Grion CMC, Bonametti AM, Medeiros EAS, Matsuo T (2007) Multivariate analysis of the factors associated with the risk of pneumonia in intensive care units. *Braz J Infect Dis* 11(3): 339-344.
9. Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H (2010) Guia de antimicrobianos em veterinária. Artmed. Porto Alegre: 268.
10. Ramey Andrew M, Hernandez J, Tyrlov V, Uher-Koch BD, Schmutz JA, et al. (2017) Antibiotic- Resistant *Escherichia coli* in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. *EcoHealth* 1(1): 1-10.
11. WHO (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization Geneva, Switzerland.
12. Wang J, Ma Z, Zeng ZL, Yang X, Huang Y, et al. (2017) The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool Res* 38(2): 55-80.
13. Laxminarayan R, Watal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, et al. (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13(12): 1057-1098.
14. Shobrak MY, Abo-Amer AE (2015) Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Braz J Microbiol* 45(4): 1199-1209.
15. Matias CAR, Pereira IA, Reis, Rodrigues DP, Siciliano S (2016) Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Brazilian J Microbiol* 47(4): 882- 888.
16. Sato G, Oka C, Asaqi M, Ishiguro N (1978) Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 241(4):407-417.
17. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 245 (1-2): 407-417.

18. Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posaut A, Stalder GL, Hoffmann D, et al. (2013) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the mecC gene, isolated from wildlife. J Antimicrob Chemother 68(10): 2222-2225.
19. Porrero CM, Valverde A, Fernandez-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, et al. (2014) *Staphylococcus aureus* carrying mecC gene in animals and urban wastewater, Spain. Emerg Infect Dis 20(5): 899-901.
20. Drobni M, Bonnedahl J, Hernandez J, Haemig P, Olsen B (2009) Vancomycin-resistant enterococci, point barrow, Alaska, USA. Emerg Infect Dis 15(5): 838-839.
21. Sellin M, Palmgren H, Broman T, Bergstrom S, Olsen B (2000) Involving ornithologists in the surveillance of vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 6(1): 87-88.
22. Lee K, Iwata T, Nakadai A, Kato T, Hayama S, et al. (2011) Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Campylobacter* spp. in feral raccoons (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. Zoonoses Public Health 58(6): 424-431.
23. Aberkane S, Compain F, Barraud O, Ouédraogo A, Bouzinbi N, et al. (2015) Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* avian isolate from France cocarrying the blaVIM-1 and blaVIM-4 genes. Antimicrob Agents Chemother 59(10): 6594-6596.
24. Weis AM, Storey DB, Taff CC, Townswnd AK, Huang BC, et al. (2016) Genomic comparison of *Campylobacter* spp. and their potential for zoonotic transmission between birds, primates, and livestock. Applied and Environmental Microbiology 82(24): 7165-7175.
25. Silva EFA, Barros JFS, Fraga KB, Magalhães CP, Garcia JE, et al. (2016) Cloacal Enterobacteria isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile. Braz J Vet Res Anim Sci São Paulo 53(2): 207-213.
26. Borges CA, Cardozo MV, Beraldo LG, Oliveira ES, Maluta RP, et al. (2017) Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. J Microbiol 55(5): 344-348.
27. Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, et al. (2017) High prevalence of CTX-M- 15-type ESBL-producing *E. coli* from migratory avian species in Pakistan. Front Microbiol 8(2476): 1-9.
28. Bonnedahl J, Järhult JD (2014) Antibiotic resistance in wild birds. Ups JMed Sci 119(2): 113-116.

29. Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, et al. (2013) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24(1): 25-31.
30. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, et al. (2012) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8(4): 251-259.
31. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, et al. (2006) Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57(6): 1215-1219.
32. Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, Porczak A, et al. (2013) Characterization and comparison of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS One* 8(9): e76150.

5 ARTIGO II**PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DA OROFARINGE DE *Rupornis magnirostris* (GMELIN, 1788) E *Caracara plancus* (MILLER, 1777)**

(Artigo submetido ao periódico *Applied and Environmental Microbiology*)

Perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de microrganismos isolados da orofaringe de *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) e *Caracara plancus* (Miller, 1777)

Fernanda Alda da Silva^{a,b}, Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros^c, Sérgio Dias da Costa Junior^c, Ana Emília Medeiros Roberto^d, Sarah Brandão Palácio^c, Reginaldo Golçalves de Lima Neto^d, Rejane Pereira Neves^e, Carolina Peixoto Magalhães^b, José Eduardo Garcia^f, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{a,c,#}

^aUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^bUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Anatomia, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^cUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco, Brazil

^dUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia, Centro de Biociências (CB), Recife, Pernambuco, Brazil

^eUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Culturas e Pesquisas *in vitro*, Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Recife, Pernambuco, Brazil

^fUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

#Autor correspondente: isabella.cavalcanti@ufpe.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar microrganismos com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtores de biofilme na orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*. Seis *R. magnirostris* e seis *C. plancus* foram obtidos do IBAMA. As amostras foram coletadas e transferidas para caldos para identificação de *Staphylococcus aureus*, enterobactérias e leveduras por análise bioquímica ou espectrometria de massa MALDI-TOF. O perfil de resistência fenotípica dos microrganismos foi analisado segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para a avaliação da produção de biofilme, foram utilizados o método do vermelho congo e a coloração com cristal violeta. Dez animais apresentaram cepas de *S. aureus* e/ou enterobactérias, representados por todos os espécimes de *R. magnirostris* e 4 *C. plancus*. Oito cepas de *S. aureus* foram identificadas, sendo 1 caracterizada como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e 4 como *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA). Vinte e sete cepas de enterobactérias foram identificadas e 11 cepas foram caracterizadas como *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e 2 como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Com relação à análise fúngica, 10 leveduras, como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. glutinis* e *Trichosporon coremiiforme* foram identificadas em 7 animais. Todas as leveduras apresentaram resistência ao fluconazol ou à anfotericina B. Em relação à produção de biofilme, dentre os 8 isolados de *S. aureus* e 27 isolados de enterobactérias, 3 e 16 cepas foram produtores de biofilme, respectivamente. Em relação às 10 leveduras, 7 foram consideradas produtoras de biofilme. Assim, a presença de microrganismos com perfil de resistência e produtores de biofilme em aves de rapina é preocupante, destacando sua possível influência na disseminação de infecções em centros urbanos.

Palavras-chave: gavião-carijó; carcará; silvestres; bactérias; leveduras; resistência; biofilme.

Importância

Raptores são considerados bioindicadores da qualidade ambiental devido ao seu papel ecológico. Além disso, algumas espécies podem se adaptar a ambientes antropogênicos, como *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*, sendo expostos a uma grande variedade de elementos, incluindo várias espécies de microrganismos. Estudos que relatam à identificação de microrganismos resistentes a antimicrobianos e produtores de biofilme em aves de rapina são escassos. Aves de rapina, assim como outros grupos de aves, podem ser considerados reservatórios potenciais ou até mesmo vetores de patógenos, bem como indicativos de uma possível troca de fatores de virulência entre patógenos na saúde humana e animal devido à convergência entre habitats urbanos e selvagens quando consideramos espécies adaptadas a ambos os ambientes.

Introdução

O Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) e o Carcará (*Caracara plancus*) pertencem às ordens Falconiformes e Accipitriformes, respectivamente. Ambas as espécies possuem grande distribuição pela América, principalmente na América do Sul, sendo bem distribuídas no território brasileiro (1). Esses animais habitam diferentes tipos de ambientes incluindo áreas urbanas, além de frequentar beiras de estradas a procura de alimento, bordas de matas e pastagens. Essas aves de rapina possuem importante papel ecológico de controle das populações de pequenos animais, sendo consideradas predadoras de topo de cadeias e teias alimentares, ajudando a manter estável o equilíbrio ecológico do ecossistema em que vivem (2).

As aves de rapina são consideradas bioindicadoras de qualidade ambiental, devido ao seu papel ecológico, porém, elas também são afetadas pelas alterações das condições ambientais, podendo ser indicadoras da conservação do habitat ao qual estão inseridas (2, 3). Além disso, algumas espécies podem se adaptar a ambientes antropizados, como é o caso do *Rupornis magnirostris* e do *Caracara plancus*, sendo assim expostos a uma grande variedade de compostos químicos e biológicos presentes nesse ambiente (4, 5). Aves de rapina de vida livre, assim como outros grupos de aves, podem ser consideradas reservatórios ou mesmo vetores de patógenos de importância para a avicultura industrial, pois estudos sorológicos demonstram que as mesmas ficam expostas aos microrganismos pelo contato com resíduos e escoamento de granjas, pela ingestão de carcaças contaminadas ou ainda pela contaminação de metais pesados dispensados no ambiente (3, 6, 7).

Esse contato com áreas antropizadas aumenta também o contato dessas aves com microrganismos resistentes a antimicrobianos. O nosso grupo de pesquisa

já identificou enterobactérias em swab retal com perfil de resistência presentes em Gaviões-carijó (*Rupornis magnirostris*), entre eles, *E. coli* resistente à ampicilina, cefalotina e ciprofloxacina, *K. pneumoniae* resistente à ciprofloxacina, ceftriaxona e imipenem e *Salmonella* spp. com resistência simultânea à ampicilina e cefalotina (8). Esses animais além de serem acometidos por infecções geradas por esses microrganismos, assumindo um papel de agente bioindicador, podem se tornar reservatórios e potenciais disseminadores desses agentes devido a sua capacidade migratória (9, 10).

Além da possível colonização dessas aves por microrganismos com perfil de resistência, esses agentes infecciosos também podem ser produtores de fatores de virulência, como, por exemplo, biofilme. Um biofilme consiste em um grupo de células sésseis, mono ou multiespécies, podendo ser de origem bacteriana ou fúngica, que estão aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e cercadas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS). Os microrganismos em biofilme expressam diferentes tipos de fisiologias, metabolismo, fenótipos e transcrição genética (11, 12). A formação do biofilme possui algumas etapas, dentre elas a adesão inicial, seguida da passagem do microrganismo da forma planctônica para a sésil, formação de microcolônias, maturação e destacamento das células para a colonização de outro sítio; a etapa de adesão pode ser ainda categorizada como um processo de dois estágios: fixação inicial reversível e fixação irreversível, onde o biofilme fixado irreversivelmente suporta forças de cisalhamento físicas ou químicas mais fortes (13). A estrutura física do biofilme contribui para resistência aos antimicrobianos, em alguns tipos de bactérias, e pode explicar a cronicidade ou recorrência de infecções, pois as bactérias em um biofilme tendem a ser mais

resistentes a agentes antimicrobianos e conseqüentemente exigem maiores concentrações desses agentes para inibir sua formação ou erradicá-los (14).

Uma vez que a identificação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e produtores de biofilme em aves de rapina são escassos, esse estudo se propõe a identificar esses patógenos isolados da orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*. Dessa forma pretende-se preencher essa lacuna na área científica e contribuir com a saúde pública, já que essas espécies estão presentes em ambientes antropizados e podem se tornar disseminadores desses patógenos.

Resultados

Identificação de *Staphylococcus aureus* com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtores de biofilme

Staphylococcus aureus foi identificado em oito (67%) das 12 aves analisadas, representados por todos os espécimes de *R. magnirostris* e dois espécimes de *C. plancus* (Tabela 1). Em relação aos perfis de resistência analisados, VRSA foi identificado em 50% das amostras, enquanto o perfil MRSA estava presente em 13% das amostras, os 37% restantes dos isolados da orofaringe das aves eram MSSA. Considerando a presença dessas bactérias na espécie *R. magnirostris* identificamos uma incidência de 50 % de MSSA, 33% de VRSA e 17% de MRSA. Enquanto na espécie *C. plancus* VRSA esteve presente em 100% das amostras (Tabela 1).

Quanto à produção de biofilme, os resultados do método qualitativo utilizando o vermelho congo foram fiéis aos resultados do método quantitativo através da coloração com cristal violeta. Dos 8 isolados de *S. aureus*, 3 foram produtores de

biofilme no método qualitativo (37,5%) (Figura 1). A partir dos dados do método quantitativo, foi possível observar que destes 3 isolados produtores de biofilme, 2 isolados eram fracamente produtores (66,7%) e um isolado foi fortemente produtor de biofilme (33,3%). Na espécie *R. magnirostris* 67% das amostras foram considerados não produtores de biofilme, 17% como fortemente produtores e 16% como fracamente produtores. Enquanto na espécie *C. plancus* 50% das amostras foram fracamente produtoras de biofilme e os outros 50% foram fortemente produtoras (Tabela 1).

Figura 1: Identificação da produção de biofilme em microrganismos isolados da orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus* pelo método de vermelho congo.

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de *Staphylococcus aureus* isolados de orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*.

Animais	Perfil de resistência	Produção de biofilme	
		Vermelho congo	Cristal violeta
<i>Rupornis magnirostris</i> 1	MSSA	-	Não produtor
<i>Rupornis magnirostris</i> 2	MRSA	+	Fraco
<i>Rupornis magnirostris</i> 3	MSSA	-	Não produtor
<i>Rupornis magnirostris</i> 4	MRSA	-	Não produtor
<i>Rupornis magnirostris</i> 5	MSSA	-	Não produtor
<i>Rupornis magnirostris</i> 6	MRSA	+	Forte
<i>Caracara plancus</i> 1	MRSA	+	Fraco
<i>Caracara plancus</i> 2	MRSA	-	Não produtor

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina; -: não produtor de biofilme; +: produtor de biofilme.

Identificação de *Enterobacteriaceae* com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtores de biofilme

Nove animais apresentaram enterobactérias (75%), incluindo todos da espécie *R. magnirostris* e três aves da espécie *C. plancus*. Vinte e sete espécies de enterobactérias foram isoladas e em todos os animais foi identificada a coexistência de duas a quatro espécies diferentes. O patógeno com maior frequência de isolamento foi *Escherichia coli* (25%), isolado em 6 animais, seguido por *Salmonella* spp. (15%), *Klebsiella oxytoca* (15%) e *Proteus* spp. (15%) identificados em quatro animais. Além de *Shigella* spp. (10%), *Klebsiella pneumoniae* (10%) e *Salmonella typhimurium* (10%) isolados em três animais (Tabela 2).

Quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, das 27 enterobactérias isoladas nos animais, 11 cepas eram ESBL (41%) e 2 isolados eram KPC (7%). Os resultados para cada espécie demonstraram a presença de 37% do perfil ESBL e 10% de KPC nas amostras provenientes de *R. magnirostris*, enquanto os isolados da espécie *C. plancus* apresentaram 50% do perfil ESBL e os outros 50% restantes não apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos (Tabela 2).

Quanto à produção de biofilme, dos 27 isolados de enterobactérias, 16 foram produtores de biofilme no método qualitativo (59%). A partir dos dados do método quantitativo, foi possível observar que destes 16 isolados produtores de biofilme, 4 isolados eram fracamente produtores (25%) e 12 isolados foram fortemente produtores de biofilme (75%). Levando em conta as espécies analisadas foi identificado que na espécie *R. magnirostris* 37% das amostras não foram produtoras de biofilme, 5% fracamente produtoras e 58% moderadamente produtoras de biofilme. Enquanto na espécie *C. plancus* 50% das amostras foram identificadas

como não produtoras de biofilme, 37% fracamente produtoras e 13% como moderadamente produtoras de biofilme (Tabela 2).

Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de *Enterobacteriaceae* isolados de orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*.

Animais	Identificação bacteriana	Perfil de resistência	Produção de biofilme	
			Vermelho congo	Cristal violeta
<i>Rupornis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	SR	+	Moderado
<i>magnirostris</i> 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SR	+	Fraco
	<i>Shigella</i> spp.	SR	-	Não produtor
	<i>Proteus</i> spp.	ESBL	-	Não produtor
<i>Rupornis</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	SR	+	Moderado
<i>magnirostris</i> 2	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	-	Não produtor
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ESBL	+	Moderado
<i>Rupornis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	SR	+	Moderado
<i>magnirostris</i> 3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	+	Moderado
	<i>Escherichia coli</i>	KPC	-	Não produtor

<i>Rupornis</i>	<i>Escherichia coli</i>	SR	-	Não produtor
<i>magnirostris</i> 4	<i>Salmonella</i>	SR	+	Moderado
	<i>thyphimurium</i>			
	<i>Proteus</i> spp.	SR	-	Não produtor
<i>Rupornis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	SR	+	Moderado
<i>magnirostris</i> 5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SR	+	Moderado
	<i>Proteus</i> spp.	ESBL	-	Não produtor
<i>Rupornis</i>	<i>Shigella</i> spp.	ESBL	+	Moderado
<i>magnirostris</i> 6	<i>Salmonella</i> spp.	ESBL	+	Moderado
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	+	Moderado
<i>Caracara</i>	<i>Salmonella</i> spp.	ESBL	+	Moderado
<i>plancus</i> 2	<i>Escherichia coli</i>	SR	-	Não produtor
<i>Caracara</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ESBL	-	Não produtor
<i>plancus</i> 4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	Fraco
	<i>Proteus</i> spp.	SR	+	Fraco

<i>Caracara</i>	<i>Shigella</i> spp.	SR	-	Não produtor
<i>plancus 5</i>	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	-	Não produtor
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SR	+	Fraco

SR: Sem resistência; ESBL: *Enterobacteriaceae* produtor de β -lactamase de espectro estendido; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; -: não produtor de biofilme; +: produtor de biofilme.

Identificação de leveduras com perfil de resistência e produtores de biofilme

Foram identificadas leveduras em 7 dos 12 animais (58,3%), sendo representados por 4 animais da espécie *R. magnirostris* e 3 da espécie *C. plancus*, totalizando 10 espécies isoladas. Dessas 10 leveduras, 2 foram identificadas como *Candida metapsilosis* (20%), 2 eram *Rhodotorula mucilaginosa* (20%), 2 eram *Trichosporon coremiiforme* (20%), 1 isolado era *Rhodotorula glutinis* (10%), 1 era *Cryptococcus* sp. (10%), 1 era *Candida* sp. (10%) e 1 era *Candida ciferri* (10%) (Tabela 3).

Quanto ao perfil de susceptibilidade dos isolados de leveduras foi possível observar que os isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* apresentaram resistência ao fluconazol e susceptibilidade à anfotericina B. Entretanto, os isolados de *Trichosporon coremiiforme* apresentaram resistência à anfotericina B e susceptibilidade a fluconazol. *Candida metapsilosis*, *Candida ciferri* e *Rhodotorula glutinis* apresentaram susceptibilidade dose dependente ao fluconazol, mas foram suscetíveis à anfotericina B (Tabela 3).

Quanto à produção de biofilme, dos 10 isolados de leveduras, 7 foram produtores de biofilme (70%) e todos eles foram classificados como fracamente produtores de biofilme (100%). A espécie *R. magnirostris* apresentou 83% de amostras fracamente produtoras de biofilme e 17% não produtoras, enquanto a espécie *C. plancus* apresentou 50% de amostras fracamente produtoras de biofilme e os outros 50% não apresentaram a capacidade de produção de biofilme (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme de leveduras isoladas de orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus*.

Animais	Identificação das espécies	CIM _{AmB} ^a (µg/mL)	Susceptibilidade	CIM _{FLU} ^b (µg/mL)	Susceptibilidade	Produção de biofilme	
						Vermelho congo	Cristal violeta
<i>Rupornis magnirostris</i> 1	<i>Candida metapsilosis</i>	0,25	S	0,50	S	+	Fraco
<i>Rupornis magnirostris</i> 2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	S	64	R	+	Fraco
<i>Rupornis magnirostris</i> 3	<i>Candida metapsilosis</i>	0,125	S	1	S	–	Não produtor
	<i>Candida</i> sp.	0,06	S	2	S	+	Fraco
	<i>Cryptococcus</i> sp.	0,50	S	4	S	+	Fraco
<i>Rupornis magnirostris</i> 5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	S	64	R	+	Fraco

<i>Caracara</i> <i>plancus 1</i>	<i>Candida ciferri</i>	1	S	16	SDD ^e	+	Fraco
<i>Caracara</i> <i>plancus 2</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,50	S	32	SDD	–	Não produtor
	<i>Trichosporon</i> <i>coremiiforme</i>	4	R ^d	0.0125	S	–	Não produtor
<i>Caracara</i> <i>plancus 3</i>	<i>Trichosporon</i> <i>coremiiforme</i>	4	R	0.06	S	+	Fraco

CIM_{AmB}: concentração inibitória mínima de anfotericina B; CIM_{FLU}: concentração inibitória mínima de fluconazol; S: susceptível;

R: resistente; SDD: susceptibilidade-dose dependente; +: produtor de biofilme; -: não produtor de biofilme.

Discussão

A disseminação de microrganismos patogênicos com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtores de biofilme é de interesse para a saúde humana e animal (10). Nesse contexto, a identificação desses patógenos em animais, como por exemplo, aves, é bastante relevante.

Estudos recentes também identificaram *Staphylococcus aureus* em aves. Sousa e colaboradores (15) identificaram a presença de *S. aureus* em 37,5% de amostras nasais provenientes de aves de rapina em Portugal. Dipineto e colaboradores (16) identificaram a presença de 87,7% de *S. aureus* em isolados provenientes de pelotas de aves de rapina.

Quanto às amostras de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos, outros estudos já isolaram essas bactérias em diversos sítios anatômicos de aves silvestres. No estudo realizado por Walther e colaboradores (17) foi isolado MRSA em 2,3% das feridas de aves exóticas. Loncaric e colaboradores (6) também identificaram isolados de MRSA em amostras fecais de uma população migratória de gralhas (*Corvus frugilegus*) e Konicek e colaboradores (18) isolaram MRSA em aves silvestres na Áustria e na República Checa, em amostras provenientes da conjuntiva, coana e cloaca de espécies como cisne (*Cygnus olor*), peneireiro-vulgar (*Falco tinnunculus*) e gralha-preta (*Corvus corone*). Estudos que analisaram o genótipo de MRSA e dados de suscetibilidade em espécies silvestres sugerem que esses genótipos tenham sido originados em humanos e gado, mas foram disseminados afetando organismos selvagens (6, 7).

Os relatos de identificação de VRSA em aves são escassos, pois a vancomicina é usada de forma restrita em tratamentos de algumas infecções. Em nosso estudo, 50 % dos isolados de *S. aureus* eram VRSA. O alerta de transferência

de genes de resistência entre cepas de diferentes espécies de *Staphylococcus* que infectam humanos e animais já existe há alguns anos (19, 20). A resistência à vancomicina também ocorre em outras espécies do gênero *Staphylococcus*, como no estudo de Ishihara e colaboradores (21) que identificou *Staphylococcus succinus* com genes de resistência à vancomicina e a capacidade de formar biofilme, em isolados da saliva das aves canoras silvestres.

Dados relacionados a *S. aureus* formadores de biofilme em aves também são raros, entre os poucos estudos enfatizamos o estudo realizado por Nematí e colaboradores (22) que identificaram genes associados a produção de biofilme em isolados de *S. aureus* provenientes de narinas, pele e cloaca de animais saudáveis e de lesões na cabeça de aves domésticas de fazendas.

Enterobactérias também foram identificadas em aves por outros autores, como Silva e colaboradores (8) analisaram amostras da cloaca de Gavião–carijó e observaram uma frequência de 77,8% de *E. coli* nessas amostras. Dipineto e colaboradores (16) analisaram isolados bacterianos provenientes de pelotas de aves de rapina e obtiveram uma frequência de *E. coli* em 65,8% de suas amostras; já no estudo de Vidal e colaboradores (23), a mesma espécie esteve presente em 35% de amostras clínicas provenientes de diversas espécies de aves de rapina com sinais clínicos de septicemia ou desordens sistêmicas. *E. coli* é a bactéria entérica comensal mais prevalente em humanos e animais, porém pode se tornar patogênica em alguns casos e causar graves diarreias e danos na região entérica (12).

Outros estudos com aves de rapina também identificaram a presença de *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp. como na pesquisa de Vela e colaboradores (24) com amostras cloacais do abutre-fouveiro (*Gyps fulvus*) (10%). Silva e colaboradores (8) isolaram *Salmonella* spp. em 55,6% das amostras da cloaca de

Gavião–carijó. Dipineto e colaboradores (16) identificaram *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae* em amostras de regurgito de aves de rapina em uma frequência de 2,7% e 16,4%, respectivamente. *Klebsiella oxytoca* foi descrito por Silva e colaboradores (8) em amostras da cloaca de Gavião–carijó em uma frequência de 11,1% nas amostras. As espécies de *Klebsiella* são consideradas patógenos relativamente comuns em aves, sendo as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* as mais envolvidas em processos patológicos nesses animais (25). A *Klebsiella pneumoniae* é uma importante bactéria que pode ser multirresistente (MDR) afetando também seres humanos, inclusive em infecções hospitalares associadas à alta mortalidade (26). As espécies do gênero *Salmonella* são conhecidas colonizadoras de intestinos de mamíferos, aves e répteis, mas também podem ser dispersas no ambiente contaminando água, solo e alimentos, sendo uma via de contaminação entre essas espécies e humanos. O sorotipo mais comum de *Salmonella* identificado em aves selvagens é *Salmonella typhimurium*. Infecções humanas causadas por *S. typhimurium* provenientes de aves de jardim já foram descritas (25, 27).

Shigella spp. foi isolada em 4% em amostras cloacais de pombos (28), enquanto a espécie de *Proteus* spp. foi descrita por Vidal e colaboradores (23) em 6,5% das amostras clínicas provenientes de diversas espécies de aves de rapina diagnosticadas com doenças sistêmicas. Vela e colaboradores (24) isolaram *Shigella* spp. em 8% e 13,3% das amostras cloacais e faríngeas do abutre-fouveiro (*Gyps fulvus*), respectivamente. Espécies do gênero *Shigella* causam em humanos uma patologia denominada Shigelose (disenteria bacilar), que por sua vez gera perturbações gastrointestinais podendo haver destruição de células entéricas. A transmissão dessa patologia ocorre por via fecal-oral, alimentos ou água

contaminados, estando mais presente em locais onde a higiene pessoal e dos alimentos é deficiente (29). Já as espécies de *Proteus* geralmente são consideradas bactérias comensais no trato intestinal humano e são mais identificadas clinicamente por causar infecções no sistema urinário, porém também são encontradas no solo e na água (29, 30). Recentemente houve a identificação de *Proteus* spp. como potenciais patógenos na recorrência da doença de Crohn, ressaltando a importância de análises mais cuidadosas para o potencial patogênico das espécies (31).

Perfis de resistência a antimicrobianos em bactérias da família *Enterobacteriaceae* são considerados ameaças para a saúde pública por seu potencial zoonótico (6, 32). A produção de β -lactamase continua a ser o fator mais importante para resistência a β -lactâmicos, devido a inativação enzimática dos antibióticos β -lactâmicos, tornando-os ineficazes (32). Representantes da família *Enterobacteriaceae* provenientes de animais de vida livre produtoras de ESBL já foram relatados, sendo na sua maioria em aves. Apesar de várias bactérias do grupo *Enterobacteriaceae* produzirem esse perfil de resistência, na maioria das vezes ESBL foi identificado em *E. coli* seguido de *K. pneumoniae* (33). Loncaric e colaboradores (6) identificaram isolados *Enterobacteriaceae* ESBL em amostras fecais provenientes de populações de gralhas (*Corvus frugilegus*) residentes e migratórias na Áustria. Pinto e colaboradores (34) descreveram isolados de *E. coli* produtores de ESBL em amostras cloacais de aves de rapina em Portugal.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) são as carbapenemases de classe A mais frequentes e são, na sua maioria, codificadas por enzimas de *K. pneumoniae*. A disseminação de microrganismos com esse perfil de resistência é preocupante, pois há dificuldade em terapias eficientes para tratamento de infecções causadas por KPC devido a uma limitação em relação aos antibióticos disponíveis

para seu tratamento. Em humanos, as infecções associadas ao perfil KPC tendem a apresentarem quadros sistêmicos (35). Muitas vezes o mecanismo de resistência de KPC não é identificado por testes de sensibilidade de rotina, causando alerta devido ao seu grande potencial de disseminação (35). Em relação à identificação de KPC em animais, os dados na literatura são escassos e restritos a animais domésticos, como o caso do estudo de Stolle e colaboradores (36) que identificou esse perfil em cães.

Algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* são conhecidamente produtoras de biofilme, como é o caso da *E. coli* e da *Salmonella* spp.. Biofilmes formados por cepas de *E. coli* são considerados difíceis de tratar. No estudo de Olson e colaboradores (37) os biofilmes de *E. coli* isolados de aves, suínos e bovinos se mostraram resistentes a maioria dos antimicrobianos analisados. No estudo de Nandanwar e colaboradores (38) os resultados mostraram que isolados de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) provenientes de aves e mamíferos foram capazes de formar biofilmes, além de serem resistentes a atividade bactericida de soro humano e aviário, ressaltando um potencial risco zoonótico.

Estudos com comunidades de aves selvagens são escassos, porém há estudos sobre a análise da presença das enterobactérias produtoras de biofilme em aves de corte e produtos derivados. Chuah e colaboradores (39) analisaram amostras de cepas entéricas de espécies de *Salmonella* a partir de amostras de aves e amostras ambientais coletadas de mercados úmidos no norte da Malásia. Todas as cepas produziram biofilme e 69,3% delas eram fortes produtoras de biofilme. Estudos que analisam a presença de biofilme de *Salmonella* spp. consideram esse biofilme como fontes de constantes contaminações de sistemas de

produção avícola, gerando impactos econômicos e na saúde pública, destacando a necessidade de prevenção (40).

Diversas espécies de leveduras são patogênicas para humanos e animais, inclusive aves de vida livre. Lord e colaboradores (41) identificaram a espécie *Rhodotorula glutinis* em 4,44% das amostras provenientes de amostras fecais de aves selvagens. Costa e colaboradores (42) fizeram uma análise em amostras de fezes e cloaca de pombos no nordeste do Brasil, identificando a espécie *R. mucilaginosa* em 8 animais. Vidal e colaboradores (23) analisaram isolados de amostras clínicas provenientes de aves de rapina e identificaram a presença de *Candida* spp. em 25% das suas amostras de lesões no Inglúvio.

Costa e colaboradores (42) relataram 27,6% *Cryptococcus* spp. em amostras fecais de pombos, particularmente *C. neoformans* e *C. laurentii*. Cafarchia e colaboradores (43) identificaram *C. laurentii* e *C. neoformans* em amostras provenientes da cloaca de aves de rapina. Estudos referentes a identificação do gênero *Trichosporon* são escassos, um deles é o estudo de Marinho e colaboradores (44) que identificou *Trichosporon* spp. em 13,9% das amostras de fezes de passeriformes em cativeiro.

Representantes do gênero *Candida* causam a candidíase, uma patologia que afeta geralmente regiões cutâneas e mucosas, além de trato genital e gastrointestinal de animais e humanos. Nas aves há relatos de candidíase afetando principalmente a região superior do sistema digestório, tendo destaque para a região da orofaringe e esôfago (45). Em um estudo com aves de rapina, Samour e Naldo (45) identificaram candidíase através de sinais clínicos e culturas fúngicas positivas para *Candida albicans*.

Já havia sido descrito na literatura a resistência a agentes antimicrobianos em leveduras isoladas de aves. Lord e colaboradores (41) também identificaram leveduras com resistência, como por exemplo, *Candida albicans*, *C. laurentii*, *T. pullulans*, *R. rubra* e *R. glutinis*, em amostras fecais provenientes de aves selvagens. Costa e colaboradores (42) identificaram cepas de *Cryptococcus* spp. resistentes a caspofungina em amostras fecais de pombos.

As leveduras o gênero *Candida* são capazes de formar biofilmes e esses biofilmes desenvolvem uma estrutura tridimensional com a presença de micronichos, além de apresentar variados mecanismos de resistência tornando a levedura resistente a diversos antifúngicos (46).

No nosso estudo, *R. magnirostris* apresentou uma maior incidência de cepas fúngicas, o que pode indicar uma maior chance do desenvolvimento de infecções fúngicas, quando comparado os espécimes de *C. plancus*. Além disso, ressaltamos a presença de algumas cepas de fungos com resistência a antifúngicos, em espécimes de *R. magnirostris* e de susceptível-dose dependente em *C. plancus*. Marinho e colaboradores (44) identificaram 19,4% de *Trichosporon* spp., 13,9% de *C. gatti*, 11,1% de *C. neoformans*, 11,1% de *Candida* spp. em amostras de fezes de passeriformes em cativeiro.

Mendes e colaboradores (47) também comprovaram a presença de algumas cepas fúngicas em suas análises em fezes de aves silvestres, relatando a presença de *Candida albicans* (31%), *C. famata* (11%), *C. guilliermondii* (4%), *C. catenulata* (4%), *C. intermedia* (2%), *C. sphaerica* (4%), *C. ciferri* (6%), *Trichosporon asahii* (2%), *Rhodotorula* sp. (2%), *Cryptococcus laurentii* (4%) e *Candida globosa* (2%). A identificação de microrganismos patogênicos em aves silvestres é de suma importância para esclarecimento de como o contato e compartilhamento do

ambiente com humanos podem ser considerados como fator importante na contaminação e dispersão de doenças.

A fragmentação e degradação dos habitats, o isolamento das populações e a maior proximidade com os seres humanos e seus animais de estimação prejudicaram a saúde dos animais selvagens. Além disso, os animais mantidos em cativeiro ou transportados por um curto período podem ser expostos a uma variedade de patógenos e se tornarem portadores potenciais de doenças infecciosas podendo afetar o ecossistema que se encontram e também humanos que tenham contato com os mesmos (47). As aves são infectadas por microrganismos diversos, incluindo espécies de interesse para a saúde pública por também serem patógenos para humanos e animais domésticos. Essa contaminação ocorre através de diversas vias, como a alimentação e meio ambiente contaminados, o uso de antimicrobianos e contato com o homem e outros animais (9, 10, 48). Assim, uma vez presente nas aves, essas bactérias também podem ser via de contaminação para humanos devido a presença desses animais em ambientes antropizados (25, 48, 49).

A grande preocupação do isolamento de *S. aureus* com perfil de resistência e produtores de biofilme em aves são as possíveis infecções que esses animais podem transmitir aos seres humanos. *S. aureus* é conhecidamente um colonizador epitelial oportunista presente em humanos e animais, quando o sistema imunológico do hospedeiro está debilitado pode causar doenças como osteomielite, pneumonia, meningite, artrite, endocardite, septicemia, abscessos de tecidos profundos, infecções de pele e tecidos moles, bem como a síndrome do choque tóxico, entre outros (23). Quanto as enterobactérias, esses microrganismos podem ser identificados em aves e em humanos sendo responsáveis por gastroenterites, doenças respiratórias, septicemia e até mortalidade (48, 49). Em relação as

leveduras, existem diversas espécies com potencial zoonótico e que podem causar doenças como candidíase, infecções cutâneas e oculares, e problemas mais graves em pacientes imunodeprimidos, como meningite e infecção pulmonar (50).

As infecções causadas por *S. aureus*, enterobactérias e leveduras estão se tornando fonte de alerta e preocupação devido ao surgimento de cepas resistentes decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos (39, 49).

A formação de biofilme é um dos mais importantes fatores de virulência para o desenvolvimento de infecções microbianas. Espécies produtoras de biofilme possuem destaque em relação às doenças, pois assumem papel importante na cronicidade das infecções e no óbito dos pacientes infectados, em especial devido à dificuldade no tratamento utilizando antimicrobianos convencionais (12, 38, 46).

Material e Métodos

Obtenção dos animais

Seis *Rupornis magnirostris* e seis *Caracara plancus* foram utilizados, com diferentes pesos e idades, obtidos do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) - IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). O projeto de pesquisa possui a licença concedida pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA), o Centro de Biociências (CB) da UFPE, recebendo a devida autorização no processo número 23076.045832 / 2016-42 e autorização do SISBIO, com número 57230 -1.

Coleta das amostras

Para a coleta das amostras as aves foram imobilizadas para acesso a cavidade da orofaringe. As amostras de orofaringe foram coletadas com swab

estéril, as quais foram transferidas para o caldo Brain Heart Infusion (BHIB) para a identificação de *Staphylococcus aureus*, caldo tetrionato sem iodo para identificação de *Enterobacteriaceae* e caldo Sabouraud para identificação de leveduras. Todas as amostras foram transportadas em caixa de poliestireno, adequadamente lacrada para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória, na Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para posterior identificação dos microrganismos.

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Amostras do BHIB foram semeadas em ágar Baird Parker a 35 ± 2 °C por 48 h para identificação de *Staphylococcus aureus*. Após a incubação, as colônias típicas de *S. aureus* (colônias transparentes com centro enegrecido) foram submetidas à coloração de Gram e a testes bioquímicos, como a produção de catalase, coagulase, DNase e manitol, para confirmar a presença de *Staphylococcus aureus* (51). Adicionalmente, foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle.

Identificação de *Enterobacteriaceae*

Amostras do caldo tetrionato foram semeadas em ágar MacConkey e ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e reincubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após o período de incubação, as amostras que apresentaram características de crescimento microbiano compatíveis com *Enterobacteriaceae* foram submetidas aos testes bioquímicos para confirmar a presença destas bactérias (52). Utilizou-se a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como referência para a identificação.

Identificação de leveduras

As leveduras foram submetidas à análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd: yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany). A extração proteica das amostras para análise proteômica seguiu a metodologia de Lima-Neto e colaboradores (2014). Sumariamente, cinco picogramas (2 a 3 UFC) foram diluídos em 900 mL de etanol absoluto e 300 mL de água destilada esterilizada e centrifugadas a 9600 g por 2 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 50 mL de acetonitrila pura e 50 mL de ácido fórmico foram adicionados e agitados em vórtex. Um microlitro e meio do extrato foi depositado em placas de aço polido (Bruker Daltonics Inc.).

Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 1 µL da solução saturada da matrix ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e levemente homogeneizado. As incubações foram padronizadas em 20h aerobicamente a 37 °C. Todas as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Os espectros para determinação do perfil proteico dos isolados foram obtidos através do laser Nd:YAG a 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada acima do limiar para a produção de íons. Um kit proteico (protein calibration standart I, Bruker Daltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas foram usadas para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrada usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 300 tiros de laser acumulados por perfil e 8 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 2.400 disparos de laser somados. A lista de picos foi exportada ao software MALDI Biotyper™ 3.1 (Bruker Daltonics, Bremem, Germany) onde as identificações finais foram realizadas através da presença ou ausência dos picos proteicos identificados nas amostras, comparando-os com picos padrões de cada levedura.

Identificação do perfil de resistência aos antimicrobianos

Testes de susceptibilidade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*

A identificação dos perfis de resistência dos microrganismos foi realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (54). As amostras positivas para *S. aureus* foram submetidas ao método de difusão em disco, bem como o teste de microdiluição e triagem em agar, para a identificação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA).

Para o método de difusão em disco, os inóculos dos microrganismos foram ajustados para 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas contendo ágar Müller-Hinton. Os discos de cefoxitina (CTX) (30 µg), teicoplanina (TEC) (30 µg), oxacilina (OXA) (1 µg) e vancomicina (VAN) (5 µg) foram depositados e as placas foram incubadas a 35 ± 2 ° C. por 24 h para posterior análise dos resultados pela leitura dos halos de inibição usando os pontos de corte do CLSI (54). *S. aureus* foram considerados resistentes a CTX, TEC, OXA e VAN quando os halos de inibição estavam abaixo de 21, 10, 10 e 14 mm, respectivamente.

O teste de microdiluição foi realizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Inicialmente, o caldo Müller-Hinton foi depositado em todos os poços das placas de microdiluição. OXA ou VAN foram distribuídos através de diluições seriadas, obtendo-se concentrações variando de 0,0625 a 32 µg/mL e 0,5 a 256 µg/mL, respectivamente. Os inóculos bacterianos foram ajustados para 0,5 da escala de McFarland, diluídos e depositados nas placas na concentração de 10⁵ UFC/mL. Finalmente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e após incubação a CIM foi determinada como a menor concentração onde não havia crescimento microbiano através de uma leitura por espectrofotometria a 620 nm. O

perfil de suscetibilidade foi determinado através dos pontos de corte do CLSI (54). *S. aureus* foram considerados resistentes à OXA e VAN quando as CIMs estavam acima de 4 e 8 µg/mL, respectivamente.

Na triagem em ágar para OXA e VAN, inicialmente foram preparadas placas contendo MHA, 4% NaCl e 6 µg/mL de OXA e placas contendo ágar Brain Infusion Heart (BHIA) e 6 µg/mL de VAN. Em seguida, os inóculos dos microrganismos foram ajustados para 0,5 da escala de McFarland e semeados nas placas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e após a incubação as placas foram observadas contra a luz para observação do crescimento bacteriano. Qualquer crescimento após 24 horas de incubação foi considerado resistente a OXA e/ou VAN (54). Todo o experimento foi realizado em triplicata em dois dias diferentes. Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controles para a identificação de resistência à meticilina.

Testes de susceptibilidade antimicrobiana para *Enterobacteriaceae*

A identificação do perfil de resistência das *Enterobacteriaceae* foi realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (54). Os testes utilizados neste estudo foram método de difusão em disco, teste de aproximação e teste de Hodge.

No método de difusão em disco, os inóculos dos microrganismos foram ajustados para 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas contendo MHA. A ceftazidima (CAZ) (30 µg), CTX (30 µg), cefpodoxima (CPD) (10 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), imipenem (IMP) (10 µg) e meropenem (MEM) (10 µg) discos foram depositados e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para posterior análise

dos resultados pela leitura dos halos de inibição utilizando os pontos de corte do CLSI (54).

O teste de aproximação foi realizado para determinar as *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL). Inicialmente, os inóculos dos microrganismos foram ajustados para 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas contendo MHA. Posteriormente, o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (10 μ g) foi adicionado no centro das placas e os discos ATM e CAZ foram adicionados com uma distância de 20 a 25 mm do AMC, nos lados da placa. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e foi analisado se houve aumento do diâmetro do halo de inibição ou aparecimento da zona fantasma, distorção do halo ao redor do disco β -lactâmico (54).

O teste de Hodge foi realizado para determinar *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Inicialmente, *Escherichia coli* ATCC 25922 foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland e semeada em placas contendo MHA. No centro das placas foi adicionado um disco de IMP. Posteriormente, com o auxílio de uma alça, as amostras testes foram estriados próximos ao disco de IMP. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e analisadas quanto à presença de distorção no halo de inibição, o que é indicativo da produção de carbapenemases (54). Todo o experimento foi realizado em triplicata em dois dias diferentes. Foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pseudomonas* ATCC 700603 como padrões para os testes realizados.

Testes de susceptibilidade antimicrobiana para leveduras

A identificação do perfil de resistência das leveduras foi realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (54, 55). Inicialmente o meio RPMI

1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) foi distribuído nas placas de microdiluição. A fim de obter um inóculo de levedura contendo $1-5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, cada cepa foi cultivada em um tubo contendo 20 mL de ágar Sabouraud dextrose (SDA) e extrato de levedura a 35 °C por 24 h para *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. e isolados de *Trichosporon* spp., e 48 h para isolados de *Cryptococcus* spp. Após este tempo, as suspensões de levedura foram transferidas para salina 0,85% e mantidas a 28 ± 2 °C e depois foram ajustadas para 90% de transmitância a 530 nm. Duas diluições seriadas de 1:100 e 1:20 sequencialmente foram realizadas para obtenção de um inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como cepa de referência. Em seguida, os fármacos padrões fluconazol (Pfizer Inc., Nova York, EUA) e anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Princeton, EUA) foram solubilizados em água deionizada e dimetilsulfóxido, respectivamente, e distribuídos em diluição seriada para obter a faixa de concentração variando de 0,0312 a 64 µg.mL⁻¹.

As microplacas foram incubadas a 35 °C em incubadora sem CO₂ e foram avaliadas visualmente após 48 horas. A CIM correspondeu a menor diluição do fármaco que apresentou inibição de crescimento de pelo menos 50% quando comparada a leveduras não tratadas para fluconazol e que inibiu completamente o crescimento quando comparado ao inóculo não tratado para anfotericina B. Os testes foram realizados em duplicata.

Avaliação da produção de biofilme em bactérias e leveduras

Teste de ágar vermelho do congo

A determinação qualitativa da produção de biofilme dos isolados bacterianos e fúngicos foi realizada de acordo com o método do ágar vermelho congo (56, 57). As suspensões bacterianas e fúngicas foram ajustadas a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/ml) em BHIB, incubados a 35 ± 2 °C por 24 h e semeados em placas contendo agar vermelho congo. Posteriormente, foram incubados em ambiente aeróbio a 35 ± 2 °C por 48 h. Após esse período, as colônias que apresentaram coloração enegrecida, com consistência seca ou rugosa, foram consideradas produtoras de biofilme. Colônias vermelhas com consistência mucosa foram consideradas como não produtoras de biofilme. Todo o experimento foi realizado em triplicata e em 3 dias diferentes.

Método da coloração com cristal violeta

A quantificação da produção de biofilme por bactérias e leveduras foi realizada pelo método de coloração violeta cristal, descrita por Stepanović et al. (58) e Marcos-Zambrano et al. (59), respectivamente. Para a produção de biofilme bacteriano, as bactérias foram ajustadas em caldo triptona de soja (TSB) suplementado com glicose a 1% no ponto 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL) e distribuídas em placas de microdiluição. Para a produção de biofilme fúngico, as leveduras foram ajustadas em meio RPMI 1640 no ponto 0,35 da escala de McFarland (10^6 UFC/mL) e distribuídas em placas de microdiluição. As microplacas de bactérias e fungos foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e 48 h, respectivamente. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, 200 µL de metanol 99% foi adicionado por 15 minutos e, em seguida, os poços foram esvaziados. Subsequentemente, o cristal violeta foi adicionado e as placas que foram incubadas a 37 °C durante 30 min.

Posteriormente, o conteúdo dos poços foi removido, os poços foram lavados com tampão fosfato e foi adicionado ácido acético glacial 30%. Finalmente, a densidade óptica (DO) foi quantificada por espectrofotometria a 570 nm (fotômetro de microplacas Multiskan FC, Thermo scientific, Madrid, Spain). Poços contendo apenas meio de cultura foram usados como controles. As cepas foram classificadas em quatro categorias com base nos valores de DO dos biofilmes em comparação com DOc (Densidade óptica de controle). As cepas foram classificadas como não aderentes se $DO \leq DOc$; fraca produção se $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; produção moderada se $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$; ou produção forte se $4 \times DOc < DO$ (53). Todo o experimento foi realizado em triplicata e em 3 dias diferentes.

Conclusão

Os resultados deste estudo são relevantes e significativos para o preenchimento da lacuna existente na medicina veterinária e humana no que diz respeito à identificação de microrganismos resistentes e produtores de biofilme em aves de rapina. *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus* apresentaram microrganismos patogênicos de interesse para a saúde pública humana, como *Staphylococcus aureus*, enterobactérias e leveduras, além de espécies com perfil de resistência a meticilina, vancomicina, carbapenêmicos e fármacos produtores de β -lactamase de espectro estendido, anfotericina B e fluconazol e com capacidade de produção de biofilme. Esses achados destacam o potencial dessas aves como reservatório de microrganismos, além de poder indicar uma possível disseminação de patógenos na saúde humana e animal, devido à convergência entre habitats urbanos e silvestres.

Agradecimentos

F. A. Silva agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Referências

1. Bierregaard RO, Jr Boesman P, Kirwan GM. 2017. Roadside Hawk (*Rupornis magnirostris*). In: Handbook of the Birds of the World Alive. Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A., de Juana, E., Eds., Barcelona, Spain, Lynx Edicions.
2. Tinajero R, Barragán F, Chapa-Vargas L. 2017. Raptor functional diversity in scrubland-agricultural landscapes of Northern-Central-Mexican dryland environments. *Tropical Conservation Science*, 10: 1-18.
3. Andreazz P, Marcos MPM, Santiago ES. 2017. "A avifauna em duas áreas de uma zona rural com remanescentes de mata atlântica no noroeste fluminense, Rj." *REINPEC-Revista Interdisciplinar Pensamento Científico* 2 (2).
4. Da Silva LTR, Oliveira Filho EF, Kunst TH, Rolim VPM, Alcântara JS, Rgueira RFS, Paim APS, Soares PC, Oliveira AAF. 2017. Concentrações de metais pesados em caracóis-do-sul (*Caracara plancus*) de vida livre na Região Nordeste do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45: 1-8.
5. Berglund ÅMM. 2014. Evaluating blood and excrement as bioindicators for metal accumulation in birds. *Environmental Pollution*, 233: 1198-1206
6. Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, Walzer C. 2013. Comparison of ESBL–and AmpC producing *Enterobacteriaceae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLoS One*, 8(12): e84048.

7. Porrero MC, Mentaberre G, Sánchez S, Fernández-Llario P, Gómez-Barrero S, Navarro-Gonzalez, N, Serrano E, Casas-Diaz E, Marco I, Fernández-Garayzabal JF, Mateos A, Vidal D, Lavín S, Domínguez L. 2013. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *The Veterinary Journal*, 198(1): 127-130.
8. Silva EFDA, Barros JFSD, Fraga KB, Magalhães CP, Garcia JE, Cavalcanti IMF. 2016. Cloacal enterobacteria isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile. *Braz. j. vet. res. anim. sci*, 53(2): 207-213.
9. Bonnedahl J, Järhult JD. 2014. Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2): 113-116.
10. SILVA FA, Palácio SA, Garcia JE, Cavalcanti IMF. 2018. Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria in Birds. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 3(4): 1-3.
11. Hernández-Fillor RE, Báez-Arias M, Alfonso-Zamora P, Espinosa-Castaño I. 2017. Susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelícula en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras. *Revista de Salud Animal*, 39(3): 1-13.
12. Chakraborty S, Dutta TK, De A, Das M, Ghosh S. 2018. Impacto do Biofilme Bacteriano em Medicina Veterinária: Uma Visão Geral. *Int. J. Curr. Microbiol. Aplicativo. Sci*, 7 (4): 3228-3239.
13. Renner LD, Weibel DB. 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin*, 36(5):347-355.

14. Hall CW, Mah TF. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3): 276-301.
15. Sousa M, Silva N, Igrejas G, Silva F, Sargo R, Alegria N, Benito D, Gómez P, Lozano C, Gómez-Sanz E, Torres C, Caniça M, Poeta P. 2014. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Veterinary microbiology*, 171(3-4): 436-440.
16. Dipineto L, Bossa LMDL, Pace A, Russo TP, Gargiulo A, Ciccarelli, F, Pasquale R, Vincenzo C, Fioretti A. 2015. Microbiological survey of birds of prey pellets. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 41: 49-53.
17. Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberg L, Lübke-Becker A. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Veterinary microbiology*, 127(1-2): 171-178.
18. Konicek C, Vodrážka P, Barták P, Knotek Z, Hess C, Račka K, Hess M, Troxler S. 2016. Detection of Zoonotic Pathogens in Wild Birds in the Cross-Border Region Austria–Czech Republic. *Journal of wildlife diseases*, 52(4): 850-861.
19. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko, C., Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6): 1145-1154.

20. Sfaciotte PRA, Garcia Coronel L, Osaki SC, Rezler Wosiacki S. 2015. Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(4).
21. Ishihara S, Bitner JJ, Farley GH, Gillock ET. 2013. Vancomycin-resistant gram-positive cocci isolated from the saliva of wild songbirds. *Current microbiology*, 66(4): 337-343.
22. Nemati M, Hermans K, Devriese LA, Maes D, Haesebrouck F. 2009. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian pathology*, 38(6): 513-517.
23. Vidal A, Baldomà L, Molina-López RA, Martin M, Darwich L. 2017. Microbiological diagnosis and antimicrobial sensitivity profiles in diseased free-living raptors. *Avian Pathology*, 46(4): 442-450.
24. Vela AI, Casas-Díaz E, Fernández-Garayzábal JF, Serrano E, Agustí S, Porrero MC, Sánchez del Rey V, Santiago IM, Domínguez LL. 2015. Estimation of cultivable bacterial diversity in the cloacae and pharynx in Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Microbial ecology*, 69(3): 597-607.
25. Benskin CMH, Wilson K, Jones K, Hartley IR. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*, 84(3): 349-373.
26. Navon-venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3):252-275.
27. Lawson B, De Pinna E, Horton RA, MacGregor SK, John SK, Chantrey J, Duff JP, Kirkwood JK, Simpson VR, Robinson RA, Wain J, Cunningham AA. 2014.

Epidemiological evidence that garden birds are a source of human salmonellosis in England and Wales. *PloS*, 9 (2): e88968.

28. Abbas, Maysoon S. 2016. Isolation of bacteria from birds in Baghdad. *Journal of Genetic and Envi-romental Resourses Conservation* 4: 158.

29. Johnson DI, Beck. 2018. *Bacterial pathogens and their virulence factors*. Springer International Publishing, USA.

30. Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M. 2018. *Proteus* spp. as putative gastrointestinal pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 31(3): e00085-17.

31. Wright EK, Kamm MA, Wagner J, Teo SM, Cruz PD, Hamilton, AL, Ritchie KJ, Inouye M, Kirkwood CD. 2017. Microbial factors associated with postoperative Crohn's disease recurrence. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(2): 191-203.

32. Pitout JDD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3): 159-166.

33. Wang J, Ma ZB, Zeng ZL, Yang XW, Huang Y, Liu JH. 2017. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological research*, 38(2): 55.

34. Pinto L, Radhouani H, Coelho C, da Costa PM, Simões R, Brandão RM., Carmen T, Gilberto I, Poeta P. 2010. Genetic detection of extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela natural reserve in Portugal. *Applied and environmental microbiology*, 76(12): 4118-4120.

35. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9(4): 228-236.

36. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Yvonne P, and Ewers C. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12): 2802-2808.
37. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2): 86.
38. Nandanwar N, Janssen T, Kühn M, Ahmed N, Ewers C, Wieler LH. 2014. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7): 835-842.
39. Chuah LO, Syuhada AKS, Suhaimi IM, Hanim TF, Rusul G. 2018. Genetic relatedness, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolated from naturally contaminated poultry and their processing environment in northern Malaysia. *Food Research International*, 105:743-751.
40. Rossi DA, Melo RT, Mendonça EP, Monteiro GP. 2017. Biofilms of *Salmonella* and *Campylobacter* in the poultry industry. *InTech*:93-113.
41. Lord AT, Mohandas K, Somanath S, Ambu S. 2010. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 9(1): 11.
42. Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, Rocha M F. 2010. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*, 169(3): 207-213.

43. Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D. 2006. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, 44(6): 485-492.
44. Marinho M, Táparo CV, Silva BGD, Tencate LN, Perri SHV. 2010. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do Estado de São Paulo. *Veterinária e Zootecnia*, 288-292.
45. Samour JH, Naldo JL. 2002. Diagnosis and therapeutic management of candidiasis in falcons in Saudi Arabia. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16(2):129-132.
46. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic cell*, 4(4): 633-638.
47. Mendes JF, Albano APN, Coimbra MAA, Ferreira GFD, Gonçalves CL, Nascente PDS, Mello JRBD. 2014. Fungi isolated from the excreta of wild birds in screening centers in Pelotas, RS, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(6): 525-528.
48. Matias CAR, Pereira IA, Reis EMFD, Rodrigues DDP, Siciliano S. 2016. Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Brazilian journal of microbiology*, 47(4): 882-888.
49. Costa Junior SD, Campos LAA, Palácio SB, Cavalcanti IMF. 2018. Nanoparticles as a promising therapeutic strategy for infections caused by resistant bacteria in cattle and birds. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 4(3): 1-5.
50. Holland SM, Shea YR, Kwon-Chung J. 2004. Regarding " *Trichosporon pullulans* infection in 2 patients with chronic granulomatous disease". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1): 205.

51. Brown, D, FJ et al. 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(6):1000-1018.
52. Koneman EW, Allen S. 2008. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. 6 Ed, Médica Panamericana, Porto Alegre, BRA.
53. Lima-Neto RG, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol* 45(2): 515-522.
54. CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). 2016. Approved Standards M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne. Pennsylvania USA.
55. CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). 2008. Reference method for broth dilution 473 antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
56. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8): 872-874.
57. Türkyılmaz S., Kaynarca S. 2010. The slime production by yeasts isolated from subclinical mastitic cows. *Acta Veterinaria Brno*, 79: 581-586.
58. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2): 175-179.

59. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E., Guiné, J. 2014. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (8): 1192-1198.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente, foi realizada uma revisão bibliográfica para identificar os relatos referentes à resistência aos antimicrobianos de bactérias isoladas de sítios anatômicos de diversos grupos de aves, além da análise de fatores de virulência desses patógenos de importância para a saúde pública. Foi possível observar a crescente preocupação da comunidade científica com o tema devido à identificação de microrganismos com perfis de resistência em aves domésticas e silvestres, alertando para a possibilidade dos mesmos tornarem-se disseminadores dos patógenos.

Em seguida, a partir dos estudos experimentais foram isolados da orofaringe de *Rupornis magnirostris* e *Caracara plancus* diversos microrganismos de interesse para a saúde pública e de importância clínica, dentre eles, *Staphylococcus aureus*, enterobactérias e leveduras, espécies com perfil de resistência a meticilina, vancomicina, β -lactâmicos, carbapenêmicos, anfotericina B e fluconazole, além de microrganismos com capacidade de produção de biofilme.

Em relação à análise do perfil de resistência aos antimicrobianos, foram identificados diversos microrganismos resistentes, como por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e leveduras resistentes a fluconazol e anfotericina B.

Outro dado relevante foi a identificação de muitas cepas de *S. aureus*, enterobactérias e leveduras produtoras de biofilme, destacando uma cepa de *S. aureus* que foi classificada como fortemente produtora e doze cepas de enterobactérias como moderadamente produtoras.

Adicionalmente, também foi verificada a coexistência de duas a seis espécies diferentes de microrganismos em muitos dos animais analisados, ressaltando o possível papel de reserva de diversos patógenos nas aves estudadas.

Desta forma, os resultados se mostraram preocupantes em relação à identificação de cepas com perfil de resistência aos antimicrobianos e produtoras de biofilme em aves silvestres. Uma vez que esses dados são escassos na literatura, os resultados deste estudo possuem relevância e ajudam a preencher essa lacuna na área científica e contribuem para a saúde pública.

Esses achados podem estar relacionados à fragmentação e degradação dos habitats, o que geram uma maior proximidade das aves com seres humanos e animais domésticos, possibilitando uma contaminação de microrganismos, além de tornar essas aves potenciais reservatórios e disseminadores de agentes infecciosos no meio ambiente. Assim, fica evidente a necessidade de mais estudos relacionados à avaliação desses microrganismos e sua influência na disseminação de infecções nos centros urbanos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 4, p. 251-259, 2010.
- ALMEIDA, W. M. et al. Análise histológica do trato intestinal do *Caracara plancus* (Miller, 1777). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 3, p. 425-434, 2016.
- ANDRADE BOARI, C. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- ANDREAZZI, P.; THOMÉ, M. P. M.; DA SILVA SANTIAGO, E. A avifauna em duas áreas de uma zona rural com remanescentes de mata atlântica no noroeste fluminense, RJ. **REINPEC-Revista Interdisciplinar Pensamento Científico**, Itaperuna-RJ, v. 2, n. 2, p. 45-70, 2016.
- ANTAS, P. T. Z. **Pantanal – Guia de Aves: espécies de aves da Reserva do Patrimônio Natural do SESC Pantanal**. Rio de Janeiro: SESC/Departamento Nacional, 2004.
- ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. **Southern Medical Journal**, Birmingham- AL, v. 104, n. 1, p. 40-45, 2011.
- AZEVEDO, M. AG; MACHADO, D. A.; ALBUQUERQUE, J. L. B. Aves de rapina na Ilha de Santa Catarina, SC: composição, frequência de ocorrência, uso de habitat e conservação. **Ararajuba**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 75-81, 2003.
- BASSETTI, Matteo; NICCO, Elena; MIKULSKA, Malgorzata. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 34, p. S15-S19, 2009.
- BERGLUND, Å. M. M. Evaluating blood and excrement as bioindicators for metal accumulation in birds. **Environmental Pollution**, Barking, v. 233, p. 1198-1206, 2018.
- BONNEDAHL, J.; JÄRHULT, J. D. Antibiotic resistance in wild birds. **Upsala Journal of Medical Sciences**, London, v. 119, n. 2, p. 113-116, 2014.
- BOYEN, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 135, p. 187–195, 2009.
- BRITO, G. R. R. **Análise filogenética de Cathartidae (Aves) com base em caracteres osteológicos**. 2008. 331 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BROWN, L. **Birds of prey**. 2.ed. London: Chancellor Press, 1997.

- CHAKRABORTY, S. et al. Impact of Bacterial Biofilm in Veterinary Medicine: An Overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu-India, v. 7, n. 4, p. 3228-3239, 2018.
- CHAPLIN, Charles. **Vida e pensamentos**. São Paulo: Martin Claret, 2002.
- CHEESBROUGH, M. **District laboratory practice in tropical countries**. New York: Cambridge University Press, 2006.
- COSTA JUNIOR, S. D. et al. Nanoparticles as a promising therapeutic strategy for infections caused by resistant bacteria in cattle and birds. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 1-5, 2018.
- COSTA, A. K. F. et al. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 169, n. 3, p. 207-213, 2010.
- COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto-CA, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.
- CURCINO, A.; HEMING, N.; FERABOLI, A. Predação oportunística de passeriforme em rede-de-neblina por indivíduo de *Rupornis magnirostris* (Falconiformes: Accipitridae). **Atualidades Ornitológicas**, Ivaiporã-PR, n.151, 2009.
- DIPINETO, L. et al. Microbiological survey of birds of prey pellets. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Exeter, v. 41, p. 49-53, 2015.
- EVANGELISTA, Síntia de Souza; OLIVEIRA, Adriana Cristina de. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a global problem. **Revista brasileira de enfermagem**, Brasília, v. 68, n. 1, p. 136-143, 2015.
- FERGUSON-LEES, J.; CHRISTIE, D. A. **Raptors of the world**. Boston: Houghton Mifflin Harcourt, 2001.
- FRANZO, V. S. et al. Estudo comparativo morfométrico do papo do carcará (*Polyborus plancus*). **Nucleus Animalium**, Ituverava-SP, v. 2, n. 1, p. 11-16, 2010.
- FRANZO, V. S. Estudo Biométrico do Esôfago do carcará (*Polyborus plancus*, Miller, 1777). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça-SP, n. 13, p. 1-9, 2009.
- GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P. R. Seed dispersal of *Attalea phalerata* (Palmae) by Crested caracaras (*Caracara plancus*) in the Pantanal and a review of frugivory by raptors. **Ararajuba**, São Paulo, v.12, n. 2, p. 133-135, 2004.
- GARCÍA, C. S.; DE LA GÁNDARA, M. P.; GARCÍA, F. J. C. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Madrid, v. 28, p. 12-18, 2010.
- GARGIULO, A. et al. Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 202-206, 2018.

GOMES, S. et al. Isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* em *Calidris fuscicollis* (Aves: Scolopacidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ornithologia**, Cabedelo-PB, v. 8, n. 1, p. 43-45, 2015.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D. et al. Lice of Chilean diurnal raptors. **Journal of Raptors Researchs**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 281-286, 2008.

GRANZINOLLI, M. A. M. **Ecologia Alimentar do gavião-do-rabo-branco *Buteo albicaudatus* (Falconiformes: Accipitridae) no município de Juiz de Fora, sudeste do estado de Minas Gerais**. 2003. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GUERRERO, P. P. et al. Infecciones por enterobacterias. **Medicine**, Barcelona, v. 11, n. 55, p. 3276-82. 2014.

HACKETT, S. J. et al. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science**, London, v. 320, n. 5884, p. 1763-1768, 2008.

HADLEY, Susan. Resistant gram-positive infections: where have we been, where are we now, and where are we going? **Clinical therapeutics**, New Dehli, v. 36, n. 10, p. 1298-1302, 2014.

HALL, C. W.; MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017.

HENRY, Elecia et al. Novel ferrocenyl chalcone compounds as possible **Antimicrobial Agents**. [s.l.], 2017.

HERNÁNDEZ-FILLOR, R. E. et al. Susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelícula en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v. 39, n. 3, p. 1-13, 2017.

HIDRON, A. I. et al. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 9, n. 6, p. 384-392, 2009.

HÖFLE, U.; BLANCO, J.M.; KALETA, E.F. Seroprevalence of avian paramyxovirus 1, 2, and 3 in captive and free-living birds of prey in Spain (preliminary results): implications for management of wild and captive populations. In: **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 969, n. 1, p. 213-216, 2002.

HOLLAND, S. M.; SHEA, Y. R.; KWON-CHUNG, J. Regarding "*Trichosporon pullulans* infection in 2 patients with chronic granulomatous disease". **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 114, n. 1, p. 205, 2004.

IUCN, **IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2016.1. 2016. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 29 ago. 2018.

KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258.

Antimicrobial agents and chemotherapy, Washington, v. 53, n. 8, p. 3365-3370, 2009.

KLINGER-STROBEL, M. et al. Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis—where do we stand?. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 12, n. 8, p. 1351-1374, 2015.

LANZAFAME, M. et al. *Rhodotorula glutinis*-related meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 410-410, 2001.

LEVEAU, L.M.; ISLA, F. I.; BELLOCQ, M. I. Urbanization and the temporal homogenization of bird communities: a case study in central Argentina. **Urban Ecosystems**, London, v. 18, n. 4, p. 1461-1476, 2015.

LLEDO, W. et al. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 58, n. 10, p. 256-258, 2009.

LONCARIC, I. et al. Comparison of ESBL–and AmpC producing *Enterobacteriaceae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. **PLoS One**, London, v. 8, n. 12, p. 84048, 2013.

LORD, A. T. et al. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2010.

MATIAS, C. A. R. et al. Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 882-888, 2016.

MCKINNEY, T. Anthropogenic change and primate predation risk: Crested Caracaras (*Caracara plancus*) attempt predation on mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*). **Neotropical Primates**, Belo Horizonte, v. 16, n. 1, p. 24-27, 2009.

MENQ, W. Urubus são aves de rapina? **Aves de Rapina Brasil**. [s.l.]. 2016. Disponível em: http://www.avesderapinabrasil.com/arquivo/artigos/ARB4_4.pdf. Acesso em: 18 jul. 2018.

NOGUEIRA-MIRANDA, K. D. S.; PALMEIRO, J. K.; CONTE, D.; et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* spp. evaluation of six phenotypic tests. **Microbial drug resistance**, Larchmont-NY, v. 18, n. 1, p. 66–70, 2012.

OLIVEIRA, Lílian Porto et al. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. **Journal of Food Processing and Technology**, Los Angeles, v. 2, n. 6, 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, Palo Alto-CA, v. 54, n. 1, p. 49–79, 2000.

OTTO, M. Physical stress and bacterial colonization. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1250-1270, 2014.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto-CA, v. 64, n.1, p. 175-188, 2013.

PASCOE, B. et al. Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolve from divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 11, p. 4779-4789, 2015.

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PERCIVAL, S. L.; KNOTTENBELT, D. C.; COCHRANE, C. A. (Ed.). **Biofilms and veterinary medicine**. USA: Springer Science & Business Media, 2011.

PINTO, R. M.; VICENTE, J. J.; NORONHA, D. Nematode parasites of Brazilian Accipitrid and Falconid birds (Falconiformes). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 359-362. 1994.

PORRERO, M. Concepción et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. **The Veterinary Journal**, London, v. 198, n. 1, p. 127-130, 2013.

RECHE, M. P. et al. Incidence of salmonellae in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 42-44, 2003.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS bulletin**, Cambridge, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.

RICKLEFS, R. E.; MILLER, G. L. **Ecology**. New York: WH Freeman and Co, 2000.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, W. W. M. S.; COPATTI, J. F.; ROSADO, F. R. Nidificação de gavião carijó *Rupornis magnirostris* (Falconiformes, Accipitridae) no município de Peabiru (Paraná, Brasil). **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, [s.l.], v.4, n.2, p.52-55, 2009.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome biology**, London, v.4, n. 6, p. 219, 2003.

SEIPKE, S. H. First record of Southern Caracaras (*Caracara plancus*) nesting on a human-made object. **Journal of Raptor Research**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 228-230, 2012.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. 4. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.

SILVA, E. F. A. et al. Cloacal enterobacteria isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, Gmelin, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile.

- Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 207-213, 2016.
- SILVA, F. A. et al. Dissemination of multidrug-resistant bacteria in birds. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 1-3, 2018.
- SILVA, L. T. R. et al. Heavy Metal Concentrations in Free-Living Southern Caracaras (*Caracara plancus*) in the Northeast Region of Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 45, p. 1-8, 2017.
- SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 18, p. 96-104, 2014.
- STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J. et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012.
- SWETHA, Chinta Siva et al. A study on the prevalence of zoonotic important methicillin resistant and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA & VRSA) and coagulase negative Staphylococci (MR-CNS & VR-CNS) in raw milk samples of Tirupati, Andhra Pradesh. **The Pharma Innovation**, New Delhi, v. 6, n. 9, Part A, p. 17, 2017.
- TINAJERO, R.; BARRAGÁN, F.; CHAPA-VARGAS, L. Raptor functional diversity in scrubland-agricultural landscapes of Northern-Central-Mexican dryland environments. **Tropical Conservation Science**, Menlo Park-CA, v. 10, p. 1-18, 2017.
- TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious diseases**, London v. 6, n. 1, p. 156, 2006.
- TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in avian and exotic pet medicine**. WB Saunders, v. 13, n. 2, p. 50-66, 2004.
- TORTATO, M. A. Predação de cuíca-d'água (*Chironectes minimus*: MAMMALIA, DIDELPHIDAE) por gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*: AVES, ACCIPITRIDAE). **Mastozoología Neotropical**, Mendoza, v. 16, n. 2, p. 491-493, 2009.
- TOSTES, R. et al. Molecular characterization and biochemical and histopathological aspects of the parasitism of *Haemoproteus* spp. in southern caracaras (*Caracara plancus*). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 101, n. 6, p. 687-693, 2015.
- TSAKRIS, A. et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing *Enterobacteriaceae*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3420-3426, 2009.
- TUMBARELLO, M. et al. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum- β -lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 10, p. 4085-4091, 2010.

UMARU, G. A. et al. A review of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a growing threat to veterinarians. **Nigerian Veterinary Journal**, Abuja, v. 32, n. 3, p. 174-186, 2011.

VIDAL, A. et al. Microbiological diagnosis and antimicrobial sensitivity profiles in diseased free-living raptors. **Avian Pathology**, London, v. 46, n. 4, p. 442-450, 2017.

VILLALOBOS, M. P.; BAGNO, M. A. Avian frugivores feeding on *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) fruits in Central Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, [s.l.], v. 20, n. 47, p. 4, 2013.

WALSH, Timothy R.; HOWE, Robin A. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto-CA, v. 56, n. 1, p. 657-675, 2002.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 08/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Carolina Peixoto Magalhães**

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.045832/2016-42

Certificamos que a proposta intitulada “**Histomorfometria da língua e aparelho hióide e microbiologia da orofaringe de *Rupornis magnirostris* (Gmelin, 1788) e *Caracara plancus* (Miller, 1777)**”, registrada com o nº 23076.045832/2016-42 sob a responsabilidade de Prof.ª **Carolina Peixoto Magalhães** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Vigência da autorização	Até 12/2018
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	5344041
Atividade(s)	<input checked="" type="checkbox"/> Captura <input checked="" type="checkbox"/> Coleta de espécimes <input checked="" type="checkbox"/> Marcação <input type="checkbox"/> Outras: _____
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Rupornis magnirostris</i> /Gavião-carijó e <i>Caracara plancus</i> /Carcará
Local(is) de realização das atividades	Serão obtidos 12 animais do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) – IBAMA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B – NORMAS DA APPROACHES IN POULTRY, DAIRY & VETERINARY SCIENCES

Review

Running Head

Characters: Up to 50

Font: Cambria (Headings)

Size: 12

Alignment: Left

Running head should be added in the Header along with the page numbers.

Type of Article

Research Article/ Case Report/ Review Article/ Opinion/ Short Communication/ Mini Review/ Letter to Editor

Title

Words: Up to 20

Font: Cambria (Headings)

Size: 15

Alignment: Center

Title should be in Bold and in Title Case.

Authors

List here all author names Author¹, Author² and Author³ Author¹ department, University, Country

Author² department, University, Country

Author³ department, University, Country

*Corresponding author

Author name, Affiliation, Address, City, State, Country, Tel: ; Fax: ; E-mail:

Manuscript Organization

Title

Words: Up to 20

Font: Cambria (Headings)

Size: 15

Alignment: Center

Title should be in Bold and in Title Case.

1. Abstract

Words: Up to 300

Font: Cambria

Size: 10

Abstract should include a brief content of the article.

2. Keywords

Words: Up to 10

Font: Cambria

Size: 10

The major keywords used in the article have to be mentioned.

3. Abbreviations

Font: Cambria

Size: 10

If there are any abbreviations in the article they have to be mentioned.

4. Introduction

Font: Cambria

Size: 10

Introduction should provide background, comprehensive insight on the purpose of the study and its significance.

5. Discussion

Font: Cambria

Size: 10

Discussion must illustrate and interpret the review study.

6. Conclusion

Font: Cambria

Size: 10

Conclusion should elucidate how the results communicate to the theory presented as the basis of the study and provide a concise explanation of the allegation of the findings.

7. Acknowledgements

Font: Cambria

Size: 10

Provide list of individuals who contributed in the work and grant details.

8. Conflict of Interest

Font: Cambria

Size: 10

Declare if any financial interest or any conflict of interest exists.

Note* If there are any sub headings in the body text, sub-categorize them accordingly under the heading in which they fall.

For example: 1. Heading

1.1. Sub-heading

1.1.1. Sub-sub-heading

References

Font: Cambria

Size: 10

All references should be cited in the article in a consecutive order. List here all the references in numbered order of citation in the text. List all authors if less than six. If more than five authors, list the first five followed by “et al.”

Note* Provide the link for the listed references

General style of reference

1. Journal References

Author name/s (Year) Title of article. Journal short name Volume(Issue): Full inclusive page numbers.

2. Book References

Author name/s (Year) Title of the book. (Edition), Publisher name, place, city, country, pp. full inclusive page numbers.

Author name/s (Year) Chapter/ topic name. In: Author name/s (Editors.), Book name. (Edition), Publisher name, place, city, country, pp. full inclusive page numbers.

3. Conferences

Author name/s (Year) Conference topic. Name of the conference, Country.

Figures

Figures should be clear with high resolution. Figure Legends: Description of figures/image. Font: Cambria

Size: 10

Tables

Font: Cambria Size: 10 Alignment: Center

Table: Brief descriptive title of the table

Table Abbreviations: Give here full form of all abbreviations used in the table. Give the full form even if it has been explained in the text.

ANEXO C – NORMAS DA APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the ASM Style Manual for Journals (American Society for Microbiology, 2018, in-house document [you may find the ASM Word List helpful]) and How To Write and Publish a Scientific Paper, 7th ed. (Greenwood, Santa Barbara, CA, 2011), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department. The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions. Please note that ASM uses the serial comma. On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings. Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and references, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages should have continuous line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter “oh” (O); the numeral one (1), the letter “el” (l), and the letter “eye” (I); and a multiplication sign (×) and the letter “ex” (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the “insert symbol” function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions. Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

Manuscript Submission Checklist (see detailed checklist attached)

- Double-space all text, including references and figure legends.
- Number pages.
- Number lines continuously.
- Present statistical treatment of data where appropriate.
- Avoid first-time claims.
- Provide accession numbers for all newly published sequences in a dedicated paragraph, and if a sequence or sequence alignment important for evaluation of the manuscript is not yet available, provide the information as supplemental material not for publication or make the material available on a website for access by the editor and reviewers.

- Format references in ASM style.
- Provide references for accession numbers and code (with URLs).
- Confirm that genetic and chemical nomenclature conforms to instructions. • Include as supplemental material not for publication in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript.

Supplemental Material

Supplemental material will be peer reviewed along with the manuscript and must be uploaded to the eJournalPress (eJP) peer review system at initial manuscript submission. All information required to reproduce the study (e.g., primary data sets and lists of strains and plasmids) should be placed in the manuscript, not in the supplemental material. In general, supplemental material is intended to provide access to very large data sets or other materials, such as videos, that cannot appear in the article. The decision to publish the material online with the accepted article is made by the editor. It is possible that a manuscript will be accepted but that the supplemental material will not be. All supplemental text, tables, and figures should be combined in a single self-contained document (PDF), and no supplemental material should be included in the main manuscript. Supplemental data set and movie files may be uploaded separately. The number of supplemental material files is limited to 10. Supplemental files should be submitted in the following standard formats.

- **Text, figures, tables, and legends should be included in a single PDF file.** All figures and tables should be numbered independently and cited at the relevant point in the manuscript text, e.g., “Fig. S1,” “Fig. S2,” “Table S3,” etc. Do not duplicate data by presenting them in both the text of the manuscript and a supplemental figure. Each legend should appear below its corresponding figure or table. The maximum file size is 8 MB. Please review this sample file for guidance.

- **Data set (Excel [.xls]) files** should include a brief description to Authors 10 January 2018, Instructions to Authors Applied and Environmental Microbiology aem.asm.org description of how the data are used in the paper. The maximum file size is 20 MB. Please review this sample file for guidance.

- **Movies (Audio Video Interleave [.avi], QuickTime [.mov], or MPEG files)** should be submitted at the desired reproduction size and length and should be accompanied by a legend. The maximum file size is 20 MB.

Unlike the manuscript, supplemental material will not be edited by the ASM Journals staff and proofs will not be made available. References related to supplemental material only should not be listed in the References section of an article; instead, include them with the supplemental material.

Supplemental material will always remain associated with its article and is not subject to any modifications after publication. Material that has been published previously (print or online) is not acceptable for posting as supplemental material. Instead, the appropriate reference(s) to the original publication should be made in the manuscript. Copyright for the supplemental material remains with the author, but a license permitting posting by ASM is included in the copyright transfer agreement completed by the corresponding author. If you are not the copyright owner, you must provide to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to your article, by ASM. You are responsible for including in the

supplemental material any copyright notices required by the owner. See also “Publication Fees.”

Research Articles

Research Articles should include the elements described in this section. They should not exceed approximately 6,000 words, exclusive of methods, references, figure legends, tables, and supplemental material. **Title, running title, byline, affiliation line(s), and corresponding author.** Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a main title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, all authors’ affiliations at the time the work was performed, the name(s) and e-mail address(es) of the corresponding author(s), and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) in the byline after the affiliation letter(s) of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see “Correspondent footnote” below). Indicate each author’s affiliation with a superscript lowercase letter placed after the author’s surname in the byline (separate multiple affiliation letters with commas but no space). Each affiliation should have its own line and its own superscript affiliation letter preceding it. Do not consolidate different departments at one institution into one address with a single affiliation letter, even if all affected authors belong to all of those departments. Please review this sample title page for guidance.

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations, if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments. If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Two-part abstract. Research Articles have structured abstracts consisting of two sections with their own headings: “Abstract” and “Importance.” Because the structured abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text. Please refer to the sample structured abstract for guidance. The Abstract section should be no more

than 250 words and should concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. The Importance section should be no more than 150 words and should provide a nontechnical explanation of the significance of the study to the field. Avoid abbreviations and references, and indicate the specific organism under study. When it is essential to include a reference, use the format shown under “References” below (see the “Citations in abstracts” section).

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Use only those references required to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Results. In the Results section, include only the results of the experiments; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be presented. Instructions to Authors January 2018, Instructions to Authors Applied and Environmental Microbiology aem.asm.org 11 shown except in unusual circumstances. Limit photographs (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force (g rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than to state “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, equipment, and microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying

the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc. Parameters such as temperature, pH, and salinity (or conductivity) must be reported for environmental samples that are extracted for molecular analyses. A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified. As noted above, a paragraph dedicated to new accession numbers for nucleotide and amino acid sequences, microarray data, protein structures, gene expression data, and MycoBank data should appear at the end of Materials and Methods with the paragraph lead-in "Accession number(s)." Please also provide references (with URLs) for the accession numbers.

Acknowledgments. Statements regarding sources of direct financial support (e.g., grants, fellowships, and scholarships, etc.) should appear in the Acknowledgments. A funding statement indicating what role, if any, the funding agency had in your study (for example, "The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.") may be included. Funding agencies may have specific wording requirements, and compliance with such requirements is the responsibility of the author. In cases in which research is not funded by any specific project grant, funders need not be listed, and the following statement may be used: "This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors." Statements regarding indirect financial support (e.g., commercial affiliations, consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements) are also allowed. It is the responsibility of authors to provide a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. (See the "Conflict of Interest" section above.) Recognition of personal assistance should be given in the Acknowledgments section, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein. In addition to acknowledging sources of financial support in the manuscript, authors should list any sources of funding in response to the Funding Sources question on the online submission form, providing relevant grant numbers where possible, and the authors associated with the specific funding sources. In the event that your submission is accepted, the funding source information provided in the submission form may be published, so please ensure that all information is entered accurately and completely. (It will be assumed that the absence of any information in the Funding Sources fields is a statement by the authors that no support was received.)

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and Reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References. In the reference list, references are numbered in the order in which they are cited in the article (citationsequence reference system). In the text, references

are cited parenthetically by number in sequential order. Data that are not published or not peer reviewed are simply cited parenthetically in the text (see section ii below).

(i) References listed in the References section. The following types of references must be listed in the References section:

- Journal articles (both print and online) • Books (both print and online)
- Book chapters (publication title is required)
- Patents
- Theses and dissertations
- Published conference proceedings
- Meeting abstracts (from published abstract books or journal supplements) • Letters (to the editor)
- Company publications
- In-press journal articles, books, and book chapters
- Data sets
- Code

Provide the names of all the authors and/or editors for each reference; long bylines should not be abbreviated with, Instructions to Authors Applied and Environmental Microbiology aem.asm.org “et al.” All listed references must be cited in the text. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health; available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), the primary source for ASM style (do not use periods with abbreviated words). The EndNote output style for ASM Journals’ current reference style can be found at http://journals.asm.org/site/misc/ASM_Journals.ens; click “Open” and then “Download and Install” to save it to your EndNote Styles folder (it should replace any earlier output styles for ASM journals [all ASM journals use the same reference style]). Note that DOIs are not needed for most references. ASM copy editors will automatically insert DOIs on all references in the CrossRef and PubMed databases during copyediting. URLs for government reports and other references not indexed in these databases should be provided if desired; URLs for citations of database accession numbers and code/software should be provided by you.

Follow the styles shown in the examples below.

1. Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM. 2012. In vivo and in vitro analyses of regulation of the pheromone-responsive prgQ promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J Bacteriol* 194:3386 –3394.
2. Bina XR, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE. 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). *mBio* 4:e00366-13.
3. Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D. 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* 115:e718 – e724.
4. Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2274 –2275. (Letter.) {“Letter” or “Letter to the editor” is allowed but not required at the end of such an entry.}
5. Cox CS, Brown BR, Smith JC. *J Gen Genet*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
6. Forman MS, Valsamakis A. 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276 –1288. In Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry

ML, Warnock DW (ed), Manual of clinical microbiology, 10th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.

7. da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA. 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295,AL emend. Nobre, Tru"per and da Costa 1996b, 605, p 404 – 414. In Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.

8. Fitzgerald G, Shaw D. In Waters AE (ed), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.* {Chapter title is optional.}

9. Green PN, Hood D, Dow CS. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251–254. In Crawford RL, Hanson RS (ed), *Microbial growth on C1 compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.

10. Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP. 2005. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr D-1658. {Abstract title is optional.}

11. Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ. 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. Abstr 105th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. {Abstract title is optional.}

12. Garc'ia CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, Garc'ia-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR. 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 39(Suppl 9):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}

13. O'Malley DR. 1998. PhD thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}

14. Stratagene. 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}

15. Odell JC. April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/ process if possible; the patent number is mandatory.}

16. Harrison F, Roberts AEL, Gabriliska R, Rumbaugh KP, Lee C, Diggle SP. 2015. A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity. *mBio* 6:e01129-15. {Original article that describes how data submitted to a database were generated.}

17. Harrison F, Roberts AEL, Gabriliska R, Rumbaugh KP, Lee C, Diggle SP. 2015. Data from "A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity." Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.mn17p>. {Citation for the database where the data in the previous reference were deposited; the URL is necessary.}

18. Wang Y, Rozen D. 2016. Colonization and transmission of the gut microbiota of the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*, through development. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/091702>.

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., AEM00123-18) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book. In some online journal articles, posting or revision dates may serve as the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers. Magalon A, Mendel RR. 15 June 2015,

posting date. Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor. *EcoSal Plus* 2015 doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013.

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed. Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example. Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for cooccupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol Cell Biol* doi:10.1128/MCB.00586-06. Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* doi:10.1073/pnas.041593698.

To encourage data sharing and reuse, ASM recommends reporting data sets and/or code both in a dedicated “Data availability” paragraph and in References.

The components of a complete data citation include the following:

- Responsible party (senior author, collector, agency),
- Publication year,
- Complete name of a data set, including the name of the database or repository and its URL, or the name of the analysis software (if appropriate), including the version and project,
- Publisher (if appropriate), and
- Persistent unique identifier(s) (e.g., URL[s] or accession number[s]). The following templates may be helpful. Author. Year. Description of study topic. Retrieved from Database URL (accession no. ●●●●●●). {Unpublished raw data.} Author. Year. Description or title of software (version). Repository URL. Retrieved day month year. {Software or code.}

Examples follow.

Christian SL, McDonough J, Liu C-Y, Shaikh S, Vlamakis V, Badner JA, Chakravarti A, Gershon ES. 2002. Data from “An evaluation of the assembly of an approximately 15-Mb region on human chromosome 13q32-q33 linked to bipolar disorder and schizophrenia.” GenBank [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF339794](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF339794) (accession no. AF339794). {Accession number.} Sun Z. 2013.

Reprocessed: in-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues. ProteomeXchange <http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?IDRPXD000665> (accession number requested). {Unassigned accession number.}

Hogle S. 2015. Supplemental material for Hogle et al. 2015 *mBio*. figshare <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1533034.v1>. Retrieved 16 March 2017. {Code and/or software.}

Nesbitt HK, Moore JW. 2016. Data from “Species and population diversity in Pacific salmon fisheries underpin indigenous food security.” Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.ng8pf>. {Data set in repository.}

Manuscript submissions that have appeared in preprint archives should cite the preprint in References, and the fact that a paper has appeared online before should be mentioned parenthetically at the end of the introductory section: (This article was submitted to an online preprint archive [1].) The reference should take the form noted above in reference 18.

(ii) References cited in the text. References that should be cited in the text include the following:

- Unpublished data
- Manuscripts submitted for publication • Unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings)
- Personal communications
- Patent applications and patents pending
- Websites These references should be made parenthetically in the text as follows: . . . similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data). . . . system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication). . . . as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts and posters, etc.} . . . this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.} . . . as suggested by the World Health Organization ([http:// www.who.int/campaigns/immunization-week/2017/ en/](http://www.who.int/campaigns/immunization-week/2017/en/)). URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) Citations in abstracts.

Because the abstract must be able to stand apart from the article, references cited in it should be clear without recourse to the References section. Use an abbreviated form of citation, omitting the article title, as follows. (P. S. Satheshkumar, A. S. Weisberg, and B. Moss, *J Virol* 87:10700–10709, 2013, doi:10.1128/JVI.01258-13) (J. H. Coggin, Jr., p. 93–114, in D. O. Fleming and D. L. Hunt, ed., *Biological Safety. Principles and Practices*, 4th ed., 2006) “. . . in a recent report by D. A. Hopwood (*mBio* 4: e00612-13, 2013, doi:10.1128/mBio00612-13)” Instructions to Authors 14 January 2018, Instructions to Authors Applied and Environmental Microbiology aem.asm.org This style should also be used for Addenda in Proof.

(iv) References related to supplemental material.

If references must be cited in the supplemental material, list them in a separate References section within the supplemental material and cite them by those numbers; do not simply include citations of numbers from the reference list of the associated article. If the same reference(s) is to be cited in both the article itself and the supplemental material, then that reference would be listed in both References sections.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



CRIMSON PUBLISHERS

Wings to the Research

ISSN: 2576-9162

Approaches in Poultry,
Copyright © Isabella M.ário Ferro Cava canti

Dairy & Veterinary Sciences

Mini Review

Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria in Birds

**Fernanda Alda da Silva¹, Sarah Brandão Palácio², José Eduardo Garcia³ and Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{1,2*}**¹Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Brazil²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil³Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Brazil***Corresponding author:** Isabella Macário Ferro Cavalcanti, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil, Tel: +55-81-21268587; Fax: +55-81-21268485; Email:**Submission:** March 09, 2018; **Published:** April 20, 2018

Abstract

Bacterial resistance to antimicrobials has been a major public health concern in recent years. The indiscriminate use of antimicrobials in human healthy, animal medicine and agriculture, greatly contributes to this condition. In last decade, several living organisms contaminated/infected with these antibiotic-resistant microorganisms, especially captive and wild birds, has been identified. Since birds have the ability to reach long distances through flight, especially wild birds, these animals can become agents of disseminated infection and are being considered reservoirs of resistance genes. In this context, this mini-review aims to shed light on recent findings related to the degree of contamination of these animals with resistant microorganisms as well as their potential as vectors of disease agents.

Keywords: Antimicrobial agents; Bacteria resistance; Birds; Infection

Introduction

Antimicrobials are widely used in human and veterinary medicine, as well as in agriculture, and they are an area for discussion and analysis [1-5]. The increase of resistant or multi-drug resistant microorganisms is an unavoidable consequence of the extensive use of the antimicrobial agents [1,6-10]. Although the development of bacterial resistance is a natural event in the evolutionary process of microorganisms, the irrational use of antibacterial drugs in humans and animals has accelerated this process [11,12]. In addition, the high frequency of human travel and global trade also contributes to the rapid worldwide spread of resistant microorganisms [13]. Antimicrobial resistance is a complex and multifaceted problem that involves humans and animals, as well as the environment, since resistant microorganisms were also identified contaminating the soil, food and aquatic environments, which increase the chance of a spread of these pathogens [14]. In this context, antimicrobial resistance can affect animals and humans through direct or indirect contact with the infectious agents. Birds, domestic or wild, may be contaminated/infected by resistant bacteria. These birds are known to be susceptible to several bacterial pathogens common to humans and other domestic animals, making them an agent of disseminated infection [15].

The pioneer study which reports antimicrobial resistance in wild animals revealed isolates of *E. coli* with resistance to chloramphenicol obtained from Japanese wild birds [16]. In

addition, other studies have investigated the occurrence of antimicrobial resistant bacteria in animals of different geographical areas, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) [17,18], vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. [19,20], *Salmonella* spp. [21], *Vibrio cholerae* [22] and *Campylobacter* spp. [23]. The relevance of these findings should be highlighted since wildlife animals do not tend to be directly exposed to antibiotics. For these reasons, more studies about the presence of resistant microorganisms in both domestic and wild birds are mandatory.

Bacterial resistance in poultry

Studies focusing on the identification of resistant bacteria in birds from slaughterhouses, such as broilers and poultry, are growing due to the great economic interest associated with it. Silva et al. [24] identified the *Enterobacteria* present in Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) kept in captivity of Pernambuco, Brazil, and their susceptibility to antimicrobials. In this study bacteria from resistant strains, such as *E. coli* resistant to ampicillin, cephalothin and ciprofloxacin, *K. pneumoniae* resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and imipenem, and *Salmonella* spp. with resistance to both ampicillin and cephalothin. Borges et al. [25] investigated the antibiotic resistance profile in *Salmonella* spp. isolated from aviaries and humans on farms of broilers and slaughterers in northeastern Algeria. In this study, 51.11% and 26.6% of the avian isolates were resistant to ciprofloxacin and cefotaxime, respectively, whereas

strains of *Salmonella* spp. isolated from humans were less resistant to these antibiotics (13.5% for ciprofloxacin and 16.2% for cefotaxime). One of the most alarming findings was the detection of eighteen strains of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* spp. (ESBLs) (12 avian and 6 humans).

Bacterial resistance in wild birds

Wild birds have also been studied for the isolation of bacterial strains with antimicrobial resistance. Mohsin et al. [26] have identified MultiDrug-Resistant (MDR) *E. coli* in wild birds in Pakistan. These isolates were resistant to CefoTaxime, CeftAZidime, AMPicillin, DoxyCycline, Tetracycline and Sulfamethoxazole/Trimethoprim (CTX-CAZ-AM-DC-TE-SXT), representing the most common MDR pattern (76.9%). Shobrak et al. [14] also identified the resistance profile of *E. coli* and *Escherichia vulgaris* isolates in migratory and non-migratory wild birds in the provinces of Saudi Arabia. It was reported that all isolates of non-migratory birds were resistant to oxacillin, whereas in migratory birds all showed resistance to oxacillin, chloramphenicol, oxytetracycline and lincomycin (MDR).

Antimicrobial resistance studies in isolates from wild birds are relevant, since these animals, that occupy several ecological niches, can play an important role as biomarkers, being able to acquire microorganisms of human or environmental origin, reflecting the human activity and its impact on our environment. In addition, these birds can become reservoirs of antimicrobial resistant bacteria and potential disseminators of this resistance due to their large migratory capacity in a short period of time [27]. Studies that evidenced this relationship between antimicrobial resistance and migratory wild birds have been identify resistance profile in birds

from remote places. Santos et al. [28] identified resistance profiles in *Enterococcus* spp. and *E. coli* of wild birds in the archipelago of the Azores, North Atlantic Ocean. Another study identified the presence of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. (VRE) in Alaska in glaucous gulls (*Larus hyperboreus*), a limited migratory bird, which indicates that antimicrobial resistant bacteria have already spread to one of the most remote areas of America [19].

Despite these identifications in remote areas, some studies indicate that resistance levels seem to correlate with the degree of human activities [29,30]. A study conducted in Chile showed that the prevalence of ESBL-producing *E. coli* among Franklin gulls (*Leucophaeus pipixcan*) is two-fold higher than in human samples in the same area. Seagulls and humans have also been identified as sharing specific types of gene sequences found in antimicrobial resistant bacteria, which indicate transmission. Nevertheless, seagulls also share gene sequences with clinical samples of human pathogenic bacteria from central Canada, a nesting site for seagulls, suggesting that migration could be a mechanism of bacterial resistance dissemination [31,32].

Conclusion

Antimicrobials are essential for human health, as well as for animal health, but should not be used in non-rational ways.

Birds are affected by antimicrobial resistant microorganisms, including strains with sequences shared with humans, indicating the potential of transmission between them. Wild birds do not naturally come into contact with antibiotics, but they can also be colonized by resistant microorganisms. There is evidence that, in the case of wild birds, this transmission may occur from sources of environmental contamination, usually caused by human neglect. Due to the indiscriminate use of antimicrobials in hospitals and farms, for example, residues containing antimicrobials and resistance genes are discarded into the environment and can affect wild animals. In addition, the dissemination of antimicrobial resistance microorganisms can occur through the migration of wild birds, making these animals a reservoir of resistance genes. The rational use of antimicrobials is of the utmost importance and must be based on the identification of infectious agents and their antimicrobial susceptibility, apart from administration of these drugs in correct doses for the correct length of time. The correct diagnosis and prescription of antimicrobials should be achieved through continuing education of veterinarians and physicians, enlightening the population about the real indication of these medicines.

Acknowledgement

F.A. Silva thanks the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for a MSc scholarship.

References

1. Beovic B (2006) The issue of antimicrobial resistance in human medicine. Int J Food Microbiol 112(3): 280-287.
2. Martinez JL (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ Pollut 157(11): 2893-2902.
3. Vieira PN, Vieira SLV (2018) Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR 21(3): 209-212.
4. Lima MFP, Borges MA, Parente RS, Victória Júnior RC, Oliveira ME (2018) *Staphylococcus Aureus* e as Infecções Hospitalares - Revisão de Literatura. Revista Uningá Review 21(1): 32-39.
5. Arenas NE, Melo VM (2018) Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. Infectio 22(2): 110-119.
6. Mateu E, Martin M (2001) Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48(8): 569-581.
7. Aiello G, Battaglia L, Bahr Arias MV, Freitas J (2007) Determinação dos índices de infecção hospitalar em um centro cirúrgico universitário veterinário de pequenos animais. Acta Scientiae Veterinariae 35(1): 354-356.
8. Carrilho CMD de M, Grion CMC, Bonametti AM, Medeiros EAS, Matsuo T (2007) Multivariate analysis of the factors associated with the risk of pneumonia in intensive care units. Braz J Infect Dis 11(3): 339-344.
9. Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H (2010) Guia de antimicrobianos em veterinária. Artmed. Porto Alegre: 268.
10. Ramey Andrew M, Hernandez J, Tyrlov V, Uher-Koch BD, Schmutz JA, et al. (2017) Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. EcoHealth 1(1): 1-10.
11. WHO (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization Geneva, Switzerland.

12. Wang J, Ma Z, Zeng ZL, Yang X, Huang Y, et al. (2017) The role of wildlifer (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool Res* 38(2): 55-80.
13. Laxminarayan R, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, et al. (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13(12): 1057-1098.
14. Shobrak MY, Abo-Amer AE (2015) Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Braz J Microbiol* 45(4): 1199- 1209.
15. Matias CAR, Pereira IA, Reis, Rodrigues DP, Siciliano S (2016) Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Brazilian J Microbiol* 47(4): 882- 888.
16. Sato G, Oka C, Asaqi M, Ishiguro N (1978) Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl Bakteriell Orig A* 241(4):407-417.
17. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 245 (1-2): 407-417.
18. Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posaut A, Stalder GL, Hoffmann D, et al. (2013) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *J Antimicrob Chemother* 68(10): 2222-2225.
19. Porrero CM, Valverde A, Fernandez-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, et al. (2014) *Staphylococcus Aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. *Emerg Infect Dis* 20(5): 899-901.
20. Drobní M, Bonnedahl J, Hernandez J, Haemig P, Olsen B (2009) Vancomycin-resistant enterococci, point barrow, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis* 15(5): 838-839.
21. Sellin M, Palmgren H, Broman T, Bergstrom S, Olsen B (2000) Involving ornithologists in the surveillance of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 6(1): 87-88.
22. Lee K, Iwata T, Nakadai A, Kato T, Hayama S, et al. (2011) Prevalence of Salmonella, Yersinia and *Campylobacter* spp. in feral raccoons (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. *Zoonoses Public Health* 58(6): 424-431.
23. Aberkane S, Compain F, Barraud O, Ouédraogo A, Bouzinbi N, et al. (2015) Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* avian isolate from France cocarrying the blaVIM-1 and blaVIM-4 genes. *Antimicrob Agents Chemother* 59(10): 6594-6596.
24. Weis AM, Storey DB, Taff CC, Townswn AK, Huang BC, et al. (2016) Genomic comparison of *Campylobacter* spp. and their potential for zoonotic transmission between birds, primates, and livestock. *Applied and Environmental Microbiology* 82(24): 7165-7175.
25. Silva EFA, Barros JFS, Fraga KB, Magalhães CP, Garcia JE, et al. (2016) Cloacal *Enterobacteria* isolated from captive roadside hawks (*Rupornis magnirostris*, GMEIN, 1788) and their antimicrobial susceptibility profile. *Braz J Vet Res Anim Sci São Paulo* 53(2): 207-213.
26. Borges CA, Cardozo MV, Beraldo LG, Oliveira ES, Maluta RP, et al. (2017) Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. *J Microbiol* 55(5): 344-348.
27. Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, et al. (2017) High prevalence of CTX-M- 15-type ESBL-producing *E. coli* from migratory avian species in Pakistan. *Front Microbiol* 8(2476): 1-9.
28. Bonnedahl J, Järhult JD (2014) Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci* 119(2): 113-116.
29. Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, et al. (2013) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24(1): 25-31.
30. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, et al. (2012) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8(4): 251-259.
31. Skurnik D, Ruimy R, Andreumont A, Amarin C, Rouquet P, et al. (2006) Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57(6): 1215-1219.
32. Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, Porczak A, et al. (2013) Characterization and comparison of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS One* 8(9): e76150.



Creative Commons Attribution 4.0 International License

For possible submissions Click Here [Submit Article](#)

Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences

Benefits of Publishing with us

- High-level peer review and editorial services
- Freely accessible online immediately upon publication
- Authors retain the copyright to their work
- Licensing it under a Creative Commons license
- Visibility through different online platforms