

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA.

Identificação de resistência a antimicrobianos presente na microbiota de pinguins *Pygoscelis antarcticus*, *P. papua* e *Spheniscus magellanicus*

Dissertação de mestrado

VIVIAN SOUZA KLEMBERG

Porto Alegre, março 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Identificação de resistência a antimicrobianos presente na microbiota de pinguins *Pygoscelis antarcticus*, *P. papua* e *Spheniscus magellanicus*

Dissertação de mestrado

VIVIAN SOUZA KLEMBERG

Dissertação apresentada
como requisito parcial para
a obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular
e Molecular

Orientação: Prof^a Dr^a Fabiana Horn

Porto Alegre, março 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lugar de mulher é onde ela quiser.

Este trabalho é dedicado a todas as mulheres cientistas, que, mesmo com uma estrutura patriarcal ainda tão vigente na ciência, conseguiram trilhar o seu destino e revolucionar o mundo com suas descobertas.

AGRADECIMENTOS

A minha família, há quase 30 anos me apoiando;

Ao meu namorado, Caio, pelo apoio, incentivo e carinho em todas as horas

As minhas amigas, por compartilharem meus anseios antes, durante e após a execução deste trabalho;

A minha orientadora, sempre confiante em mim e também minha incentivadora;

Aos meus colegas e I.C, Rosana e João, sempre presentes e dispostos a me auxiliar;

Ao meu colega Daniel, sempre pronto a me ajudar e sempre com um ótimo papo;

Aos colegas do PPG da veterinária, que colaboraram com o meu trabalho;

A todas as bactérias existentes que descobrimos e as que ainda iremos descobrir;

Ao meu privilégio branco, de classe, que criou a minha oportunidade de estudar;

A todas as mulheres que lutaram para fazer ciência e abriram o caminho para nós, nos possibilitando trilharmos os nossos;

Ao feminismo de luta, suor nosso de cada dia;

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Pinguins e seu habitat.....	13
1.1.1 <i>Pygoscelis antarcticus</i>	16
1.1.2 <i>Pygoscelis papua</i>	18
1.1.3 <i>Spheniscus magellanicus</i>	19
1.2 Antimicrobianos: Mecanismo de Ação e Resistência Microbiana	22
1.2.1 Antimicrobianos.....	22
1.2.2 Glicopeptídeos	23
1.2.3 Tetraciclínas	24
1.2.4 Aminoglicosídeos	26
1.2.5 Macrolídeos.....	27
1.3 Gênero <i>Enterococcus sp.</i>	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32

3.1 Amostras.....	32
3.2 Isolamento bacteriano e coloração de Gram	33
3.3 Análise do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos.....	34
3.4 Extração de DNA	36
3.5 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos	36
3.6 Identificação das bactérias resistentes aos antimicrobianos	37
3.7 Sequenciamento dos amplicons dos genes de resistência.....	38
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Crescimento bacteriano das amostras de fezes de pinguins	40
4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, identificação das espécies resistentes e triagem para genes de resistência a antimicrobianos.....	43
4.3 Identificação de genes de resistência no DNA total de fezes de pinguins antárticos	50
5. CONCLUSÕES	54
6. BIBLIOGRAFIA	56
7. APÊNDICE	61
CURRÍCULO VITAE.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP Adenosina Trifosfato

BHI Caldo Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion Broth*)

CDC Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CECLIMAR Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos

CERAM Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLSI Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (Clinical and Laboratory Standards Institute)

DNA Ácido Desoxirribonucleico

FAD Flavina-adenina-dinucleotídeo

IUCN União Internacional para a Conservação de Natureza (*International Union for Conservation of Nature*)

LB ágar Ágar Lúria-Bertani

MLS_B Resistência a macrolídeo, lincosamina e estreptogramina B

PCR Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

TGI Trato gastrointestinal

VRE *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina

RESUMO

As populações de aves antárticas têm sido estudadas e consideradas indicadoras da qualidade do ecossistema marinho, especialmente dos oceanos do sul, ao longo dos últimos 50 anos. Existem cerca de 40 espécies de aves marinhas que se reproduzem em áreas descobertas de gelo. Dentre as aves marinhas antárticas, os pinguins são os que têm a maior representatividade ecológica e são considerados espécies sentinelas para o estudo das mudanças ambientais nesse continente. Esses animais representam 90% da biomassa de aves nos oceanos do sul, e suas colônias estão distribuídas nas ilhas antárticas e subantárticas bem como sobre o Continente Antártico. Há três espécies de pinguins mais representativas desta biomassa, são eles: *Pygoscelis papua* (Pinguim gentoo), *Pygoscelis adeliae* (Pinguim-de-adélia) e *Pygoscelis antarcticus* (Pinguim-de-barbicha). Os pinguins antárticos estão entre as aves de menor contato com humanos, o que os torna possíveis indicadores da presença natural de genes de resistência a antimicrobianos na microbiota intestinal de aves e no ambiente. O objetivo desta dissertação foi avaliar a presença de resistência a antimicrobianos na microbiota intestinal de *P. antarcticus* e de *P. papua*, e compará-las à microbiota de *Spheniscus magellanicus* (pinguins-de-magalhães). Os *S. magellanicus* habitam a Argentina, Chile e Ilhas Malvinas, locais em que há variadas atividades humanas.

Foram coletadas amostras de fezes aparentemente frescas de 46 pinguins *P. antarcticus* e de 12 pinguins *P. papua*, nas suas respectivas colônias na Ilha Elefante, em dezembro de 2014. De *S. magellanicus* foram coletadas, com auxílio de suabes cloacais, amostras de 19 indivíduos, encontrados na costa norte do Rio Grande do Sul, de Quintão a Torres, durante os meses de inverno de 2015 e de 2016.

As amostras de microbiota dos pinguins foram cultivadas em ágar LB e os isolados bacterianos foram triados para os seguintes antimicrobianos: eritromicina ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$), estreptomicina ($\geq 2.000 \mu\text{g/mL}$), tetraciclina ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) e vancomicina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Em 10 amostras de *P. antarcticus* e em 15 amostras de *S. magellanicus* foram identificadas bactérias resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Todas as amostras de *P. papua* foram sensíveis a esses antimicrobianos. As espécies dos isolados resistentes foram identificadas pelo sequenciamento do rRNA 16S, que revelou sete gêneros, sendo os mais recorrentes *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. Esses isolados resistentes também foram triados para a presença de genes de resistência aos antimicrobianos. O *tet(M)* foi mais abundante em *S. magellanicus* (5) do que em *P. antarcticus* (3), ao passo que o *int* e *van(B)* foram identificados somente em *P. antarcticus* (três e um, respectivamente). O gene *erm(B)* não foi encontrado em nenhum dos isolados.

Uma vez que a fração não cultivável das fezes também pode apresentar genes de resistência, foi realizada a extração do DNA das fezes de pinguins antárticos para obtermos DNA de todos os micro-organismos presentes. Os genes mais recorrentes nas amostras de DNA total das fezes de *P. antarcticus* e *P. papua* foram, respectivamente, *int* (5 e 7), seguido de *tet(M)* (1 e 5). O *van(B)* foi encontrado em amostras das duas espécies de pinguins, enquanto que o *erm(B)* foi encontrado somente nas amostras de *P. papua*.

De acordo com esses resultados, houve mais resistência a antimicrobianos na fração cultivável da microbiota de pinguins-de-magalhães do que em pinguins antárticos. Na fração não-cultivável, foram encontrados mais genes de resistência nas amostras de *P. papua* do que de *P. antarcticus*.

Palavras-chave: microbiota, *P. antarcticus*, *P. papua*. resistência microbiana, genes de resistência.

ABSTRACT

Antarctic seabird populations have been studied as bioindicators of the nature variability in the Southern Ocean marine ecosystems over the last 50 years. Among the Antarctic seabirds, the most representative species are penguins; they represent 90% of total biomass of birds in the Southern Ocean, and are considered sentinels for environmental changes in the Antarctic region. *Pygoscelis antarcticus* and *P. papua* are the most prevalent species in Antarctida. Because they remain among the wild birds with least contact with humans, their microbiota may serve as indicators of antimicrobial resistance in the environment. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial resistance present in the microbiota of *P. antarcticus* and *P. papua*, and compare it with the microbiota of *Spheniscus magellanicus* (Magellanicus penguins). Magellanicus penguins inhabit Argentina, Chile and Falkland Islands, and therefore have more contact with humans.

We have collected samples of apparently fresh feces from *P. antarcticus* ($n = 46$) and from *P. papua* ($n = 12$) in their respective colonies located in the Elephant Island in December 2014. From *S. magellanicus*, we have collected cloacal swabs ($n = 19$) from specimens found in the northern coast of Rio Grande do Sul, from Quintão to Torres, during the winter months of 2015 and 2016.

All samples were evaluated for the presence of resistant bacteria to the following antimicrobials: erythromycin ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$), streptomycin ($\geq 2.000 \mu\text{g/mL}$), tetracycline ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) and vancomycin ($32 \mu\text{g/mL}$). We have isolated resistant bacteria from 10 samples of *P. antarcticus* and from 15 samples of *S. magellanicus*; there was no bacterial growth in the presence of any of these antimicrobials from samples of *P. papua* feces. The species of resistant bacteria were identified by 16S rRNA sequencing: among the 7 genera identified, the most frequent were *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. Resistant bacteria were screened for the resistance genes *ermB*, *tet(M)*, *int* and *van(B)*. *tet(M)* was more frequent in *S. magellanicus* (5) than in *P. antarcticus* (3), while *int* and *van(B)* were identified only in *P. antarcticus* (3 and 1, respectively). The *erm(B)* gene was not identified in any isolate.

Considering that the non-cultivable fraction from feces can also harbor resistance genes, we extracted DNA from feces of the Antarctic penguins in an attempt to obtain DNA from all micro-organisms of their microbiota. The most abundant genes present in the microbiota of *P. antarcticus* and *P. papua* were, respectively: *int* (5 and 7) and *tet(M)* (1 and 5). The *van(B)* gene was found in one sample of each species, while *erm(B)* was found in only one sample of *P. papua*. According to our results, antimicrobial resistance is more frequent in the cultivable microbiota of *S. magellanicus* than of *P. antarcticus*. In the non-cultivable fraction, resistance genes were more frequent in samples from *P. papua* than from *P. antarcticus*.

Key words: microbiota, *P. antarcticus*, *P. papua*. microbial resistance, resistance genes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pinguins e seu habitat

A Antártida é o continente mais remoto e considerado o último lugar selvagem intocado pelo homem (BARGAGLI, 2008). Também é a região do planeta mais preservada, havendo muitos esforços para que assim seja mantida, de forma que o trabalho e a presença humana devem ser realizados com o mínimo impacto possível (MMA, 2007). A proteção desse ambiente, com sua biodiversidade vulnerável às mudanças ambientais, é uma das prioridades de todas as nações que operam na Antártida, expressa no Tratado da Antártida sobre a Proteção ao Meio Ambiente, assinado em Madri em 1991, e que entrou em vigor 1998. Apesar dos tratados, mudanças significativas vêm sendo observadas nessa região (MMA, 2007).

As populações de aves antárticas têm sido estudadas e consideradas indicadoras da qualidade do ecossistema marinho - especialmente dos oceanos do sul - ao longo dos últimos 50 anos (MICOL AND JOUVENTIN, 2001). São encontradas cerca de 40 espécies de aves marinhas que se reproduzem na Antártida, formando colônias com grande número de indivíduos, em áreas descobertas de gelo (BARGAGLI, 2008).

Dentre as aves marinhas antárticas, os pinguins são os que têm a maior representatividade ecológica e são consideradas espécies sentinelas para o estudo das mudanças ambientais na Antártida. Eles compõem 90% do total de biomassa da avifauna de toda a região antártica (CROXALL *et al.*, 2002). Os pinguins pertencem à família *Spheniscidae*, são aves marinhas que não voam e

passam a maior parte de sua vida dentro da água, vão para a terra somente para se reproduzir e para realizar a muda de pena. Os gêneros desta família são seis: *Spheniscus* spp, *Pygoscelis* spp, *Aptenodytes* spp, *Eudyptes* spp, *Eudyptula* spp e *Megadyptes* spp e dentro destes gêneros encontram-se 18 espécies. Os pinguins encontram-se somente no hemisfério sul, desde as Ilhas de Galápagos até a Antártida, incluindo América do Sul, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (LYNCH, 1997).

Dentre as 18 espécies de pinguins, sete são consideradas “pinguins antárticos”: *Aptenodytes fostery*, *Aptenodytes patagonicus*, *Eudyptes chrysolophus*, *Eudyptes chrysocome*, *Pygoscelis adeliae*, *Pygoscelis papua* e *Pygoscelis antarcticus*. Essas sete espécies possuem seu centro de distribuição e abundância abaixo do Paralelo 60° S, onde se reproduzem nas áreas livre de gelo tanto no continente e na península antártica como nas ilhas antárticas e subantárticas durante o verão austral (WOEHLER AND CROXALL, 1997).

As três espécies de pigoscelídeos, *Pygoscelis adeliae* (Pinguim-de-adélia), *P. papua* (Pinguim gentoo) e *P. antarcticus* (Pinguim-de-barbicha) nidificam nas Ilhas Shetland do Sul, um arquipélago formado por 19 ilhas localizadas ao norte da península antártica (WOEHLER AND CROXALL, 1997). Essas espécies reproduzem-se em colônias no final da primavera, realizam a postura de dois ovos e criam seus filhotes até a primeira metade do verão; somente no início do outono engordam e sofrem a muda. De maio a outubro os pinguins-de-adélia e os pinguins-de-barbicha deixam suas colônias e se dispersam pelo mar acompanhando a borda de congelamento do mar, enquanto os pinguins gentoo

podem ser encontrados nas colônias localizadas nas ilhas sub-antárticas ao longo do ano (LYNCH, 1997).

Os filhotes desses pinguins recebem alimentação através da regurgitação do alimento dos pais. Após atingir a plumagem completa, o filhote, agora chamado de juvenil, está pronto para caçar seu alimento na água (DEWAR *et al.*, 2013; POTTI *et al.*, 2002). A alimentação dos pinguins é baseada principalmente em peixes e em krills (*Euphausia* sp.). Essas aves estocam grande quantidade de alimento não digerido em seu estômago, a fim de estocar alimentos para si e sua prole. Seu trato gastrointestinal (TGI) também armazena grandes quantidades de proteínas e lipídeos por longos períodos (DEWAR *et al.*, 2013). A microbiota de seu TGI é diversa e complexa, formada principalmente por bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria. Essa microbiota intestinal varia conforme a idade dos pinguins e o período em que eles se encontram (jejum, reprodução ou muda), e é capaz de influenciar seu estado nutricional, fisiológico, imunológico e metabólico (DEWAR *et al.*, 2013, 2014).

Por ocorrerem no continente antártico, essas espécies de pinguins estão protegidas pelo Tratado da Antártida (assinado em Madri em 1991 e que entrou em vigor em 1998), em que os países signatários firmam o compromisso do uso deste continente apenas para fins pacíficos e de cooperação internacional para o desenvolvimento de pesquisas científicas. Os pinguins antárticos estão entre as aves marinhas menos suscetíveis à ação antrópica direta, pois ocorrem em uma região do planeta praticamente inabitada pelo homem. Isso levanta a possibilidade de que organismos de sua microbiota sirvam como indicadores da

presença natural de genes de resistência a antimicrobianos na microbiota de aves e no ambiente em que vivem.

1.1.1 *Pygoscelis antarcticus*

Os pinguins desta espécie geralmente medem 71 a 76 cm de altura, pesam de 3,0 a 4,5 kg e são facilmente identificados por possuírem uma fina linha preta abaixo de seu queixo que percorre de uma orelha a outra, dando a impressão de uma barba, o que originou o seu nome: Pinguim-de-barbicha. Os *P. antarcticus* (Fig. 1) habitam colônias localizadas em diversas ilhas antárticas, como as Ilhas Sandwich do Sul, Ilhas Shetland do Sul, Geórgia do Sul, Orkneys do Sul, Ilha Bouvet e Ilha Balleny (Fig. 2) (BIRDLIFE, 2017). Embora a extinção de *P. antarcticus* seja classificada como “menos preocupante” na lista de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), a população desses pinguins vem diminuindo (IUCN, 2017). Segundo dados de 1999, a população mundial de *P. antarcticus* é constituída por, aproximadamente, quatro milhões de pares reprodutores distribuídos pelo continente antártico (BIRDLIFE, 2017).



Figura 1. *P. antarcticus* em seu habitat.



Figura 2. Localização das Ilhas Antárticas

1.1.2 *Pygoscelis papua*

Os pinguins gentoo (Fig. 3) são caracterizados por possuírem uma mancha branca no topo da cabeça, uma cauda grande e o bico alaranjado. Medem aproximadamente 75 a 90 cm de altura, pesam entre 5,5 a 8,5 kg e são o terceiro maior pinguim, atrás somente do pinguim-rei e do pinguim-imperador (LYNCH, 1997).

Esses pinguins se reproduzem principalmente no continente antártico, nas Ilhas Kerguelen, Ilhas Shetland do Sul, Ilha Geórgia e até mesmo nas Ilhas Malvinas. Eles nidificam no solo, longe do gelo, e seus ninhos geralmente são feitos de pedra. Os filhotes permanecem no ninho até os trinta dias e chegam ao mar aproximadamente aos 80 dias de idade (LYNCH, 1997).

A população de *P. papua* é constituída por aproximadamente 387 mil pares reprodutores e está classificada pelo IUCN como espécie “menos preocupante” e sua população permanece estável (BIRDLIFE, 2017).



Figura 3. *P. papua* no ninho com seus filhotes.

1.1.3 *Spheniscus magellanicus*

Os pinguins desta espécie geralmente medem aproximadamente 70 cm de altura, pesam de 5 a 6 kg e são identificados por possuírem uma faixa branca nos olhos que se estende até o pescoço. O pinguim-de-magalhães (Fig.4) é uma espécie de pinguim que se reproduz em colônias numerosas distribuídas pela Argentina, Ilhas Falkland (Malvinas) e Chile (Fig.5). Em um levantamento de 2012, foi verificado que a população dessa espécie de pinguim está estimada entre 1,1 a 1,6 milhões de pares reprodutores, e está em declínio. Pinguim-de-magalhães é classificado como espécie “ameaçada” pela lista vermelha da IUCN (BIRDLIFE, 2017).

A ocorrência de *S. magellanicus* no Brasil apresenta sazonalidade. Esses pinguins permanecem nas colônias do sul da América do Sul desde meados de setembro até meados de abril, quando os adultos iniciam sua migração em direção ao norte, utilizando a plataforma continental em busca de alimentação (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Já os pinguins mais jovens parecem migrar mais tarde, começando em junho e permanecendo até novembro em águas brasileiras (VOOREN AND BRUSQUE, 1999). Esses pinguins podem ficar vagando até quatro anos em alto mar. São comuns os registros de bandos de pinguins-de-magalhães adultos e jovens, dispersos sobre a plataforma continental do extremo sul do Brasil em locais com grandes cardumes de anchoíta (*Engraulis anchoita*), junto a bandos de trinta-réis (*Sterna* sp.), de junho a outubro (SANDER *et al.*, 2004). Portanto, em contraste com os pinguins antárticos, o pinguim-de-magalhães tem mais contato com ambientes submetidos à ação humana.

Durante o ano de 2008, foi registrada no litoral brasileiro a presença de mais de 4.500 pinguins-de-magalhães vivos, ocupando desde o litoral gaúcho - ao sul, até o estado da Paraíba - ao Norte - incluindo praticamente todos os estados da costa brasileira nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (SCHERER *et al.*, 2011). Durante a migração, alguns fatores têm sido apontados como particularmente importantes no enfraquecimento e na mortalidade dos pinguins-de-magalhães, como a contaminação dos oceanos com petróleo e derivados, os acidentes com redes de pesca, a ingestão de detritos antropogênicos e as parasitoses gastrintestinais.

Entre junho de 1998 e dezembro de 2009, o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM) do Centro de Estudos Costeiros, Limnológico e Marinhos (CECLIMAR, Imbé, RS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul recebeu 888 pinguins-de-magalhães distribuídos assimetricamente ao longo dos anos, com uma média de 74 espécimes por ano (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em 2010 foram recebidos 52 indivíduos; em 2011, 121, a maioria encontrados sujos de petróleo; em 2012, 33; em 2013, 22; em 2014, 13, e em 2015, 44 pinguins (Maurício Tavares, comunicação pessoal). Os pinguins foram recebidos em todos os meses do ano, porém 80% dos registros concentram-se entre junho e outubro (OLIVEIRA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010). No Rio Grande do Sul o CECLIMAR resgata e reabilita esses pinguins, para após reencaminhá-los ao mar.



Figura 4. *S. magellanicus*.



Figura 5. Regiões em que se encontram *S. magellanicus*.

1.2 Antimicrobianos: Mecanismo de Ação e Resistência Microbiana

1.2.1 Antimicrobianos

O uso de antimicrobianos, após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, constitui-se em um dos grandes avanços na medicina. As doenças infecciosas bacterianas, de difícil tratamento antes disso, puderam ser controladas. Entretanto, em todos os casos o uso de antimicrobianos tem sido acompanhado pelo surgimento de bactérias resistentes.

Até recentemente, pensava-se que a resistência a antimicrobianos era, sobretudo, consequência de mutações em resposta à exposição a antimicrobianos usados na terapia humana e de animais de criação. Porém, trabalhos mais recentes têm mostrado que genes de resistência estão também presentes em micro-organismos isolados de ambientes com baixíssima probabilidade de terem recebido antimicrobianos pela ação humana e que sua existência precede o emprego de antimicrobianos pelo homem (BHULLAR *et al.*, 2012; D’COSTA *et al.*, 2011). Ou seja, assim como a produção de antimicrobianos por micro-organismos, a resistência a antimicrobianos é um fenômeno natural que independe da exposição a antimicrobianos pela ação humana. Ainda, uma análise metagenômica da microbiota humana identificou vários genes de resistência novos presentes na fração bacteriana não cultivável, que pode servir como um reservatório acessível por transferência horizontal (SOMMER; DANTAS; CHURCH, 2009). Na microbiota intestinal humana, estima-se que até 80% dos micro-organismos não são cultiváveis em condições laboratoriais (DETHLEFSEN;

MCFALL; RELMAN, 2007) e é razoável supor que o mesmo possa ocorrer entre os demais mamíferos e aves.

1.2.2 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos são uma classe de antimicrobianos com ação bactericida, que inibem a síntese da parede celular das bactérias. A inibição da síntese é consequência da ligação do glicopeptídeo à extremidade terminal dos dipeptídeos D-alanil-D-alanina, precursores do peptidoglicano que forma a parede celular bacteriana. Essa ligação impede a ação da transglicosidase e bloqueia a adição de mais monômeros de mureína, inibindo assim a síntese da parede celular (CLSI, 2012). A vancomicina e a oritavancina são alguns exemplos de glicopeptídeos. São os antimicrobianos de escolha de uso clínico nos casos de infecções por bactérias gram-positivas resistentes a β -lactâmicos ou em pacientes alérgicos a penicilinas. A vancomicina é o antimicrobiano de última escolha em pacientes com infecção por bactérias gram-positivas. As bactérias gram-positivas resistentes à vancomicina são uma das maiores ameaças à saúde humana. Como exemplo, é possível citar *Enterococcus* sp resistentes à vancomicina, conhecidos também como VRE (CDC, 2017). As bactérias gram-negativas, que incluem a Família Enterobacteriaceae, possuem resistência intrínseca à vancomicina, em decorrência da estrutura da parede celular bacteriana. O alvo da vancomicina é o peptidoglicano e, no caso das bactérias gram-negativas, ele está “protegido” pela membrana externa da bactéria, composta de lipopolissacarídeos (GILMORE, MICHAEL S; CLEWELL, 2014).

A resistência bacteriana à vancomicina ocorre por meio da alteração do sítio-alvo do antimicrobiano, em que os resíduos D-alanil-D-alanina são modificados para D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, impedindo a ligação da vancomicina a seu alvo. Como responsáveis por esta resistência é possível citar os genes *van(A)*, *van(B)*, *van(C)* e *van(D)*.

O gene *van(A)* confere resistência não só a vancomicina, mas também a teicoplanina, diferentemente do gene *van(B)*, que transmite somente resistência a vancomicina. Esses genes geralmente se encontram em elementos móveis transponíveis, como plasmídeos e transposons, e podem ser passados entre espécies ou gêneros distintos. Bactérias como *E. gallinarium* e *E. casseliflavus* possuem o gene *van(C)* na constituição de seu DNA, conferindo-lhe uma resistência intrínseca a vancomicina (GHOLIZADEH; COURVALIN, 2000; WOODFORD, 2001).

Segundo (KHAN *et al.*, 2005), o fato da avoparcina (um análogo à vancomicina) ter sido usada como promotor de crescimento em frangos de corte contribuiu para os altos índices de bactérias resistentes a esse antimicrobiano, como *Enterococcus* sp., encontrados na avicultura.

1.2.3 Tetraciclina

As tetraciclina são uma classe de antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro, empregadas na clínica humana e veterinária desde 1950 (LIN *et al.*, 2015). Alguns representantes desta classe são tetraciclina, doxiciclina e doziciclina (CLSI, 2016). Esses fármacos inibem a síntese proteica bacteriana, ao se ligarem na subunidade 30S do ribossomo e impedirem a ligação do aminoacil-

tRNA no sítio A do ribossomo, levando à inibição da continuação da síntese de proteínas (KHAN *et al.*, 2005).

As tetraciclinas são empregadas na clínica humana e veterinária, sendo aplicadas para o tratamento de doenças por *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. Na avicultura, as tetraciclinas também foram empregadas como promotores do crescimento. Não surpreendentemente, o uso intenso de tetraciclinas ao longo de mais de 60 anos acarretou a seleção de bactérias resistentes (NGUYEN *et al.*, 2014; TRZCINSKI *et al.*, 2000). Há cerca de 40 genes responsáveis por esta resistência, como *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(M)*, carregados por transposons e plasmídeos. O gene *tet(M)* geralmente é associado com o transposon Tn916/1545 (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010).

Existem pelo menos três tipos de mecanismo de resistência a esta droga: sistema de efluxo, codificada pelos genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, em que o antimicrobiano ultrapassa a parede celular, mas é bombeado para fora do citosol através da proteína de efluxo ancorada na membrana; proteção do ribossomo, em que as proteínas codificadas pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* possuem atividade GTPásica e são homólogas ao Fator de Elongação EF-tu, ligando o aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo deslocando a tetraciclina, antes ligada à subunidade 30S do ribossomo, e, assim, permitindo a síntese proteica; e modificação do antimicrobiano, em que *tet(X)* codifica uma monooxigenase, que requer FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo), que hidroxila a tetraciclina, alterando a conformação química da droga e reduzindo sua afinidade com o ribossomo bacteriano (NGUYEN *et al.*, 2014). Foram encontrados mais de 22 genes

responsáveis pelo sistema de efluxo, conferindo resistência em bactérias isoladas do meio ambiente, como lagos, rios e solo (ZHANG; ZHANG, 2011). Os genes de proteção ao ribossomo também já foram identificados em bactérias isoladas de rios, lagoas, solos e até mesmo de água potável (ZHANG; ZHANG, 2011). É importante ressaltar que *tet(M)* também já foi identificado na microbiota de pinguins antárticos (RAHMAN *et al.*, 2008).

1.2.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos de amplo espectro e foram usados pela primeira vez na clínica humana em 1944. Estreptomicina, amicacina e gentamicina são exemplos desta classe. São compostos por um grupo amino e um grupo glicosídeo e são considerados bactericidas (MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999). Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica bacteriana. Após se difundirem na parede celular da bactéria, eles ligam-se no rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A ribossômico. Essa ação leva à perturbação da elongação da cadeia polipeptídica nascente, pois não permite a leitura correta do códon de tRNA no anticódon do mRNA, o que impede a acurácia traducional, promovendo uma terminação proteica imatura ou uma leitura errada do código, criando proteínas aberrantes (MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999; SHAKIL *et al.*, 2008).

Esses antimicrobianos são indicados para o tratamento de bacilos gram-negativos aeróbicos, e, no caso de bactérias gram-positivas, são usados em combinação sinérgica com outros antimicrobianos com ação na parede celular bacteriana (como os glicopeptídeos) (FLUIT *et al.*, 2003; CLSI, 2016;). Em alguns

micro-organismos é necessário que se utilize alta concentração de estreptomicina ou gentamicina, pois bactérias como *Enterococcus* sp são resistentes a estreptomicina em concentrações usuais para gram-positivos (CLSI, 2012).

A resistência bacteriana a aminoglicosídeos pode ocorrer por pelo menos três mecanismos: redução intracelular da concentração do antimicrobiano por bombas de efluxo; alteração enzimática do antimicrobiano; e modificação do alvo do antimicrobiano.

Na segunda situação, a bactéria sintetiza enzimas que alteram a droga, como por exemplo: as acetiltransferases, que acetilam o grupo amino do aminoglicosídeo; e as O-fosfotransferases, que fosforilam a região 3'-hidroxil do aminoglicosídeo, utilizando ATP (adenosina trifosfato) como doador. As modificações causadas por essas enzimas acabam por diminuir a afinidade da droga pelo sítio A do ribossomo bacteriano (SHAKIL *et al.*, 2008; WRIGHT; THOMPSON, 1999).

A modificação do ribossomo ocorre pela metilação do rRNA 16S, causando uma modificação estrutural no sítio A da subunidade 30S e assim dificultando a ligação da droga ao ribossomo. É importante ressaltar que este mecanismo de resistência é encontrado em bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas (SHAKIL *et al.*, 2008; WRIGHT; THOMPSON, 1999).

1.2.5 Macrolídeos

Os representantes desta classe são eritromicina, amicacina e azitromicina. Possuem um amplo espectro de ação e podem ser bacteriostáticos e bactericidas, dependendo do micro-organismo e da dose utilizada (CLSI, 2012). São

largamente utilizados na clínica para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. Os macrolídeos inibem a síntese proteica bacteriana por se ligarem à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a ligação do tRNA ao ribossomo, o que inviabiliza a síntese da cadeia polipeptídica nascente (MU *et al.*, 2014).

Algumas bactérias, como *Enterococcus* sp, desenvolveram ou adquiriram três mecanismos de resistência: redução intracelular da concentração do antimicrobiano por bombas de efluxo; inativação enzimática do macrolídeo; e modificação do alvo, a subunidade 50S do ribossomo (MCARTHUR *et al.*, 2013; PECHERE, 2001). A inativação enzimática de macrolídeos resulta da hidrólise do anel de macrolactona por esterases, codificadas pelos genes *EreA* e *EreB*, que, embora menos frequente do que a modificação do ribossomo, vem disseminando-se em isolados clínicos. É importante ressaltar que ambos os genes encontram-se em plasmídeos e transposons, tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas, o que facilita a transmissão horizontal de genes de resistência (MCARTHUR *et al.*, 2013; PECHERE, 2002).

A resistência a macrolídeos também pode ser causada pela metilação da subunidade do rRNA 23S, componente da subunidade 50S, cujas enzimas são codificadas pela família dos genes *erm*. Segundo Leener *et al.* (2004) ocorre resistência cruzada entre as classes macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B, que possui a sigla de MLS_B. Isso ocorre tanto em animais quanto humanos. O gene de resistência responsável por este fenótipo é *ermB*. Ademais, os genes *ermB* e *tet(M)* (resistência a tetraciclinas) podem ser transmitidos pelo mesmo elemento genético móvel, o transposon Tn1545 (LEENER *et al.*, 2004). Bactérias

da Família Enterobacteriaceae (gram-negativas) são intrinsecamente resistentes a eritromicina.

1.3 Gênero *Enterococcus* sp.

As bactérias do gênero *Enterococcus* sp. pertencem à Família Enterococcaceae, Filo Firmicutes; são comensais de humanos e animais, e encontram-se no ambiente, no solo e na água. Em meados do século XX foram classificadas como *Streptococcus* do grupo D, pois continham o antígeno D de parede celular, formado pelo ácido teicóico. Somente mais tarde, em 1984, foram classificadas em um novo gênero, recebendo o nome de *Enterococcus* (*Entero*: relativo a intestino; *coccus*: grão). Atualmente, existem mais de 40 espécies de *Enterococcus* sp. identificadas, como *E. gallinarium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo as duas últimas de maior importância na prática clínica (WRIGHT, 2012; GILMORE *et al.*, 2014; IWERIEBOR *et al.* 2015;).

Algumas de suas características bioquímicas é a hidrólise da esculina a 40% de sais de bile, hidrólise da L-pirrolidonyl- β -naftilamida e ausência da enzima catalase; além disso, crescem em concentrações de 6,5 % de cloreto de sódio (NaCl), possuem uma ampla faixa de temperatura de crescimento, que varia entre 10 °C a 46 °C, e crescem em pH de 4,6 a 9,9. São cocos gram-positivos agrupados aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e fermentadores de glicose. Os *Enterococcus* sp. são produtores de ácido láctico, produto final da fermentação da glicose (GILMORE *et al.*, 2014; MURRAY, 2014). Uma de suas características principais é serem

intrinsecamente resistentes a alguns antimicrobianos, como cefalosporinas e oxacilinas.

Embora *Enterococcus* sp. seja considerado um micro-organismo comensal, ele pode vir a causar infecções oportunistas no seu hospedeiro. A bactéria tem emergido como uma das grandes causadoras de infecções nosocomiais, geralmente associadas à endocardite na prática clínica e, em animais, a doenças como mastite bovina, diarreias e bacteremias (GILMORE *et al.*, 2014; JUNG & RAUTENSCHLEIN, 2014; SPLICHALOVA *et al.* 2014).

Em relação à resistência a antimicrobianos, o gênero *Enterococcus* é considerado intrinsecamente resistente à penicilina, ampicilina e cefalosporina, pois eles possuem proteínas de ligação a penicilina (pbp) com baixa afinidade aos agentes microbianos citados (GILMORE *et al.*, 2014). Porém, estes agentes podem ser utilizados em sinergia com outros antimicrobianos para o tratamento de infecções por *Enterococcus* sp.

As infecções por *Enterococcus* vêm encontrando dificuldades de tratamento, devido à aquisição de resistência a antimicrobianos, através de elementos transponíveis móveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a resistência a antimicrobianos presentes em bactérias provenientes da microbiota intestinal dos pinguins antárticos Pinguim-de-barbicha (*P. antarcticus*) e Pinguim gentoo (*P. papua*) e compará-las com a resistência presente na microbiota intestinal de pinguins-de-magalhães (*S. magellanicus*). Como os pinguins antárticos estão entre as aves marinhas de menor contato com a ação humana direta, os resultados deste projeto poderão fornecer parâmetros da presença natural de resistência a antimicrobianos não só na microbiota de aves mas também no ambiente.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Identificar fenotipicamente a resistência encontrada nas amostras de fezes de *P. antarcticus*, *P. papua* e em suabe cloacal de *S. magellanicus* para os antimicrobianos eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina.
- 2.2.2 Identificar o gênero bacteriano dos isolados resistentes.
- 2.2.3 Triar os isolados resistentes para genes de resistência conhecidos de eritromicina, tetraciclina e vancomicina.
- 2.2.4 Triar o DNA total das fezes de *P. antarcticus* e *P. papua* para genes de resistência conhecidos para eritromicina, tetraciclina e vancomicina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para a realização deste trabalho foram coletadas amostras de fezes de 46 pinguins *P. antarcticus*, de 12 pinguins *P. papua* e suabes cloacais de 19 pinguins *S. magellanicus*. As amostras de fezes de cada um dos 58 pinguins antárticos foram coletadas em colônias localizadas na Ilha Elefante (Fig. 6), pertencente ao Arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, Antártida (61°S 55°W), em dezembro de 2014, pela equipe da Profa. Maria Virginia Petry, do Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (São Leopoldo, Rio Grande do Sul).

A coleta de pinguins-de-magalhães foi realizada com suabes cloacais devido à condição física que eles apresentavam no momento da coleta, pois estavam muito debilitados para defecar material sólido. Os suabes cloacais, contendo meio Stuart para transporte (ABSORVE[®]), foram coletados de 19 pinguins *S. magellanicus* que chegaram à orla sul-rio-grandense, de Quintão a Torres. A coleta foi feita assim que os pinguins foram resgatados pela equipe do biólogo Maurício Tavares, pertencente ao Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) do Instituto de Biociências da UFRGS.

As amostras de pinguins antárticos foram refrigeradas em -20 °C durante o transporte (por navio, de janeiro a abril de 2015) e posteriormente armazenadas a -80 °C. Os suabes foram mantidos a 4 °C para transporte; após crescimento bacteriano em caldo BHI (ver abaixo), foram descartados.

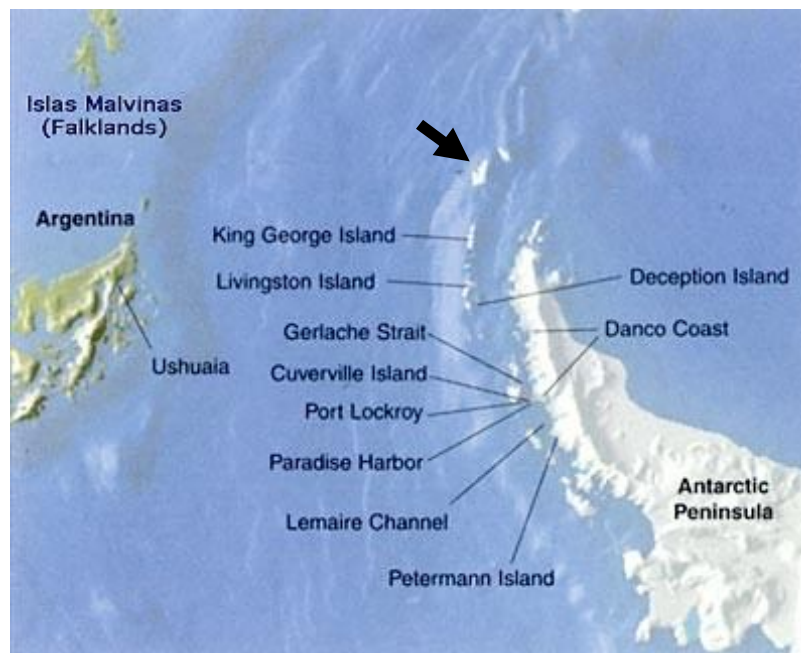


Figura 6. A seta indica a Ilha Elefante, local de coleta das amostras de fezes dos pinguins antárticos, em 25 de dezembro de 2014.

3.2 Isolamento bacteriano e coloração de Gram

Com o objetivo de obter crescimento bacteriano, foram inoculadas 0,3 g de fezes ou suabe cloacal em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusin broth, KASVI), incubados a 36°C por 24 horas. Dez microlitros desse caldo foram espalhados com alça de Drigaslky em ágar LB (Luria Bertani Agar, KASVI) e, após, foram incubados a 36°C por 24 horas. A temperatura foi escolhida de modo a privilegiar o crescimento de bactérias presentes na microbiota de pinguins em detrimento do crescimento de bactérias provenientes do solo antártico. Os caldos BHI com enriquecimento bacteriano foram armazenados em glicerol a 20% a - 80°C. Da mesma forma, as bactérias isoladas das placas de LB foram crescidas em caldo BHI e armazenadas, individualmente, em glicerol 20% a - 80°C.

Com o intuito de identificar quais bactérias eram gram-negativas ou gram-positivas, foi realizado o teste da coloração de Gram. As amostras que cresceram no ágar LB foram coradas conforme as indicações do fabricante (NEW PROV[®]). O esfregaço foi analisado com auxílio de um microscópio óptico e as bactérias foram classificadas em gram-positivas e gram-negativas. Além da coloração de gram também foi realizado o teste da produção de catalase e crescimento em NaCl a 6,5%, 37 °C.

3.3 Análise do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos

As amostras de *P. antarcticus*, *P. papua* e *S. magellanicus* que apresentaram crescimento de bactérias em ágar LB foram submetidas ao teste de microdiluição em ágar, com o objetivo de identificar qual a concentração inibitória mínima (CIM) que essas bactérias apresentam frente aos antimicrobianos estreptomicina, eritromicina, tetraciclina e vancomicina (todos da Roth). O teste foi feito baseado nas normas do documento M07-A9 do CLSI (2012). Os antimicrobianos foram dissolvidos em água para injetáveis (estreptomicina, tetraciclina e vancomicina) ou etanol 95% (eritromicina) e filtrados com filtro de seringa (KASVI) com poros de 0,22 µm. Cada antimicrobiano foi diluído a partir de uma solução-mãe cuja concentração é de 10 mg/mL (eritromicina, tetraciclina e vancomicina) ou 30 mg/mL (estreptomicina). A diluição seriada dos antimicrobianos em ágar Muller Hinton (MH), foi feita com o ágar na temperatura de 56 °C e pH entre 7,2 e 7,4.

Para a inoculação dos isolados que cresceram em LB, foi realizada suspensão de 1 a 3 colônias em PBS 1x, ajustado com a turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Após o ajuste, a suspensão foi diluída 1:10, de modo a chegar em, aproximadamente, 1 a 2 x10⁷ UFC/mL. Com o objetivo de inocular 1x10⁴ UFC/mL na placa de MH, contendo as concentrações de antimicrobianos definidas, foi inoculada 2 µL desta suspensão. A CIM foi determinada na concentração de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano.

As bactérias foram classificadas como: resistente, resistência intermediária ou suscetível de acordo com os critérios da Tabela 1. As bactérias gram-negativas não foram testadas para eritromicina e vancomicina por possuírem resistência intrínseca a esses antimicrobianos (NELSON, 1999).

Tabela1. Normas interpretativas para Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Classe	Agente antimicrobiano	CIM (µg/mL) ²		
		S	I	R
Macrolídeo	Eritromicina	≤ 0,5	1 a 4	≥ 8
Aminoglicosídeo	Estreptomicina (<i>HLAR</i>) ¹	≤ 2.000	-	≥ 2.000
Tetraciclina	Tetraciclina	≤4	8	≥ 16
Glicopeptídeo	Vancomicina	≤ 4	4 a 16	≥ 32

S: sensível; I: intermediária; R: resistente

¹ Alto nível de resistência a macrolídeos

² Os valores de referência estão de acordo com o documento M 07-A9 do CLSI (2016).

3.4 Extração de DNA

Os isolados resistentes aos antimicrobianos testados tiveram seu DNA (ácido desoxirribonucleico) extraído. A extração de DNA de colônias bacterianas foi feita utilizando o protocolo de lise alcalina: de duas a três colônias foram suspensas em 25 μ L de NaOH 0,5 M por dez minutos. Após, foi adicionado 25 μ L de Tris 1 M e 450 μ L de água de miliQ. As amostras foram guardadas em - 20 °C.

Para a extração de DNA das fezes de pinguins, foi utilizado o kit de extração de DNA QIAamp FAST DNA Stool Mini Kit (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. Porém, antes de realizar a extração, as amostras *in natura* foram pulverizadas com a ajuda de um pistilo e nitrogênio líquido (até formar um pó muito fino), a fim de extrair maior quantidade de DNA da amostra.

3.5 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos

Para identificar quais genes de resistência aos antimicrobianos estavam presentes no DNA de bactérias resistentes e no DNA total de amostras de fezes de pinguins, foi feita a reação em cadeia da polimerase (PCR) com as condições de reações e com os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2. Cada reação da PCR foi realizada com o Master Mix (Laboratório Microbiologia Celular), que constitui em um volume final de 25 μ L, sendo que 16,6 μ L deste volume era água ultra pura, 0,4 μ L era Taq polimerase 5U/ μ L, 4 μ L de cada dnTP 10 mM, 5 μ L de tampão 10x, 2 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de oligonucleotídeo *forward* e *reverse* com concentração 0,4 μ M e 2 μ L de amostra. A reação foi realizada em um termociclador da marca GenePro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer

Technology). As bactérias usadas como controle positivo foram *Enterococcus faecalis* ATCC 531 (*tet(M)*), *Enterococcus faecalis* ATCC 652 (*erm (B)*), *Enterococcus faecium* ATCC 655 (*van(B)*) e *Enterorococcus faecalis* P.A21 (*int*) .

Tabela 2. Genes de resistência a antimicrobianos, oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplicon, temperatura de *melting* e referência.

Gene	Oligonucleotídeos ¹	Tamanho (pb)	Tm (°C)	Referência
<i>erm (B)</i>	F: 3' GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 5' R: 3' AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC 5'	639	55	(MACOVEI; ZUREK, 2006)
<i>Int</i> (transposon Tn916)	F: 3' GCGTGATTGTATCTCACT 5' R: 3' GACGCTCCTGTTGCTTCT 5'	1046	50	(MACOVEI; ZUREK, 2006)
<i>tet (M)</i>	F: 3' GTGGACAAAGGTACAACGAG 5' R: 3' CGGTAAAGTTCGTCACACAC 5'	406	55	(MARTIN; ALFA; MULVEY, 2001)
<i>van (B)</i>	F: 3' AGACATTCCGGTTCGAGGAAC 5' R: 3' GCTGTCAATTAGTGCGGGAA 5'	220	56	(IWERIEBOR; OBI; OKOH, 2015)

¹F: *foward* R: *reverse*

3.6 Identificação das bactérias resistentes aos antimicrobianos

Para identificar os isolados resistentes foi feita a amplificação, a partir do DNA extraído, da região V1-V2 do 16S rRNA desses isolados. O rRNA 16S contém regiões conservadas (C1-C9) intercaladas com regiões hipervariáveis (V1 a V9) e o tamanho do amplicon é de 1500 pb (pares de base). Os gêneros e as espécies bacterianas são diferenciados com base nessas informações em níveis de 95% a 97% de identidade de sequência, respectivamente. Foi realizada a PCR para a amplificação da região V1-V9, que gerou um amplicon de 1500 pb. A reação utilizou os oligonucleotídeos (P.1) Epsilon F: AAGAG TTT GAT CCT GGC

TCAG e P2 R: GGTTACCTTGTTACGACTT (Pissetti, 2016). Esse amplicon foi submetido novamente a PCR para amplificar a região V1-V2, gerando um amplicon de 320 pb. Para tanto os oligonucleotídeos utilizados foram: P1:Epsilon e P3: R: TTGAC CGTGTCTCAGTTCCA. A região V1-V2 possui menos pares de base do que a região V1-V9 e devido a isso ela se torna melhor de ser sequenciada do que V1-V9.

A reação para o RNA 16S foi feita com o Master mix já descrito anteriormente e as condições da PCR encontram-se em Ewards e colaboradores (2001), após, amostras foram armazenadas a -20°C. Após a amplificação da região de 320pb e a confirmação por eletroforese em gel de agarose, as amostras foram purificadas com Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e foi adicionado uma alíquota de primer forward. A amostra então foi encaminhada para a empresa ACTGene/Ludwig para a realização do sequenciamento pela técnica de Sanger.

As sequências geradas foram confrontadas com o banco de dados BLAST e aquelas que apresentaram similaridade maior ou igual a 98% foram consideradas positivas para a identificação do gênero e espécie bacteriana.

3.7 Sequenciamento dos amplicons dos genes de resistência

As bactérias utilizadas como controle positivo nesta dissertação foram gentilmente cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (selvagem), *Enterococcus faecalis* ATCC 531 (*tet(M)*), *Enterococcus faecalis* ATCC 652 (*erm (B)*), *Enterococcus faecium* ATCC 655 (*van(B)*). Também

foi utilizada a cepa *Enterococcus faecalis* PA 22 (*int*). Para a confirmação da identidade dos genes alvos foi feito o seu sequenciamento.

Após a amplificação do gene e verificação do tamanho em eletroforese em gel de agarose, o DNA amplificado foi purificado com kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) e uma alíquota do primer forward foi adicionada. Após, a amostra foi encaminhada para a empresa de sequenciamento ACTGene/ Ludwig, que realizou o sequenciamento pela técnica de Sanger. Os isolados confirmatórios para o gene alvo foram utilizados como controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento bacteriano das amostras de fezes de pinguins

Do total das amostras de *P. antarcticus* ($n = 46$), *P. papua* ($n = 12$) e *S. magellanicus* ($n = 19$), 38, 6 e todas as 19, respectivamente, apresentaram crescimento bacteriano em ágar LB. As bactérias foram identificadas em gram-positivas e gram-negativas pela coloração de Gram. Nas amostras de *P. antarcticus* e *P. papua*, houve crescimento maior de bactérias gram-positivas do que gram-negativas, diferentemente das amostras de *S. magellanicus*, que tiveram maior quantidade de bactérias gram-negativas (Fig 7).

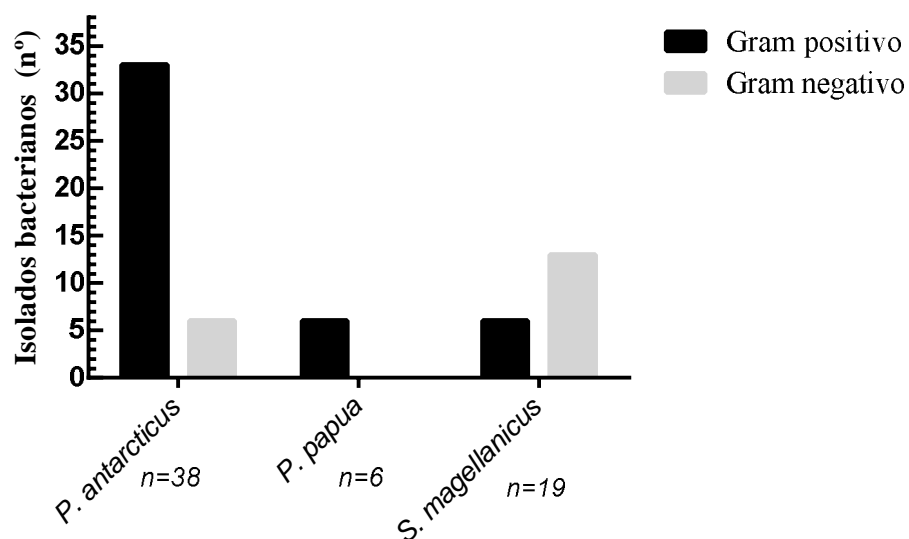


Figura 7. Presença de bactérias gram-positivas e gram-negativas nas amostras da microbiota dos pinguins

Das amostras de fezes de pinguins *P. antarcticus* e *P. papua*, as colônias observadas possuíam, em sua maioria, morfologia puntiforme e eram muito pequenas, características de *Enterococcus* sp. Devido a este fato, foi necessário o teste presuntivo de *Enterococcus* sp. A maioria das bactérias que foram identificadas como cocos gram positivos também apresentaram ausência de catalase e crescimento em NaCl a 6,5% em 36°C, sendo identificadas presuntivamente como *Enterococcus* sp (Fig. 8)

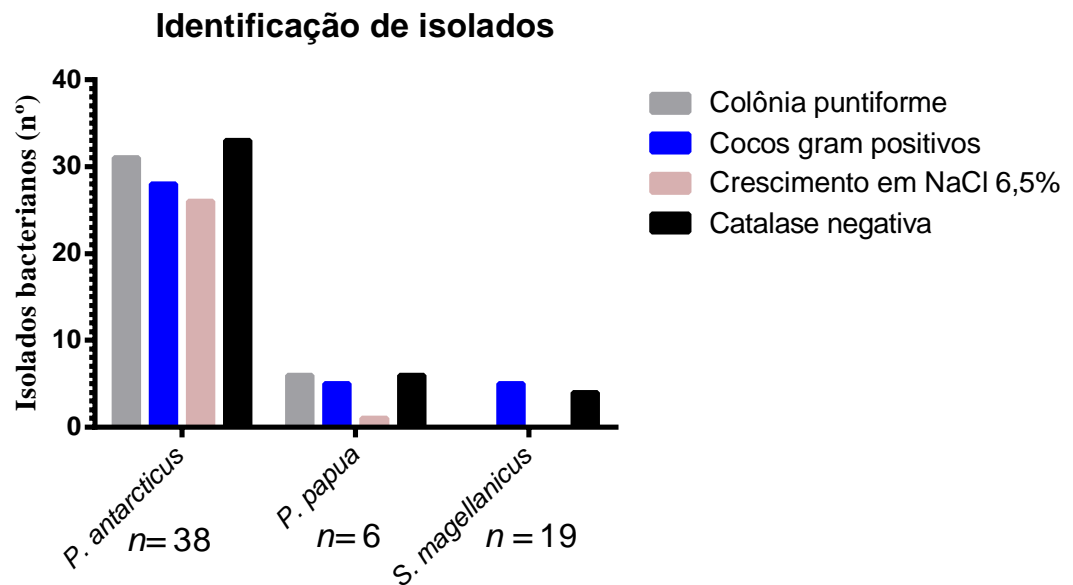


Figura 8. Teste fenotípico para identificação presuntiva de *Enterococcus* sp.

Surpreendentemente, bactérias gram-negativas foram muito difíceis de serem recuperadas das amostras de pinguins antárticos. Após o enriquecimento em caldo BHI, essas amostras foram cultivadas em ágar Macconkey a fim de privilegiar o crescimento destes micro-organismos, porém, o crescimento desses micro-organismos foi nulo. Essas amostras também foram analisadas pelo grupo

de microbiologistas do Laboratório da Dra. Marisa R. Cardoso (Faculdade de Veterinária, UFRGS), e o resultado foi o mesmo: ausência de crescimento de bactérias gram-negativas. Esses resultados foram apresentados no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia de 2015 (A1).

A quase ausência de bactérias gram-negativas cultiváveis na microbiota dos pinguins antárticos, em oposição às amostras de suabes dos pinguins-de-magalhães, pode refletir uma real diferença na composição microbiana entre os dois grupos. Alternativamente, essa diferença pode estar associada à situação em que as aves se encontravam no momento da coleta. A coleta das amostras dos pinguins antárticos se deu no verão austral, que é o momento em que os pinguins reproduzem-se, permanecem em suas colônias e sofrem a muda. Já as amostras dos pinguins-de-magalhães foram coletadas no momento em que os pinguins chegaram à orla gaúcha, a maioria deles debilitados e posteriormente tratados (POTTI *et al.*, 2002). A microbiota intestinal de pinguins sofre influência de seu estado nutricional, fisiológico, metabólico, muda e reprodução, e essa influência pode causar variações dos filos microbianos (DEWAR *et al.*, 2013, 2014).

Uma terceira hipótese é que o armazenamento em meio Stuart da amostra coletada por suabe enriquece a amostra em bactérias gram-negativas, ao contrário do que ocorre com as fezes congeladas. Essa hipótese poderá ser testada ao se coletar fezes e suabe cloacal do mesmo indivíduo.

4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, identificação das espécies resistentes e triagem para genes de resistência a antimicrobianos

As amostras que apresentaram crescimento bacteriano após enriquecimento em caldo BHI (Fig. 7) foram submetidas ao crescimento em ágar LB na presença dos antibióticos eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina. Dentre as amostras de *P. antarcticus* ($n = 38$), foram identificadas 10 amostras que possuíam bactérias resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo oito deles resistentes a um antimicrobiano e dois resistentes a dois antimicrobianos (tetraciclina e eritromicina). Dentre as amostras de *S. magellanicus* ($n = 19$), 15 possuíam bactérias resistentes, sendo 12 delas resistentes a um antimicrobiano e três resistentes a dois antimicrobianos (dois resistentes a tetraciclina e eritromicina; um resistente a tetraciclina e estreptomicina) (Fig.9). Nenhuma amostra de *P. papua* apresentou crescimento bacteriano na presença dos antimicrobianos testados.

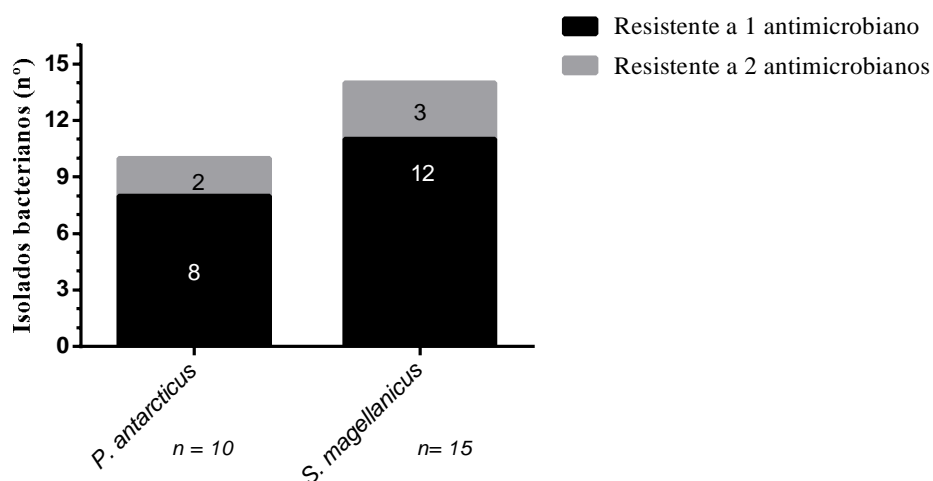


Figura 9. Amostras com bactérias resistentes a um e dois dos antimicrobianos testados.

A resistência bacteriana a eritromicina foi identificada em quatro amostras de *P. antarcticus* e em três de *S. magellanicus*. A resistência à estreptomicina foi identificada em uma amostra de *P. antarcticus* e em duas de *S. magellanicus*. A resistência à tetraciclina foi mais recorrente em *S. magellanicus* do que em *P. antarcticus*, contando com 11 bactérias contra seis de *P. antarcticus*. A resistência à vancomicina foi identificada em apenas uma amostra de cada espécie (Fig. 10). Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para cada isolado encontram-se na Tabela 3.

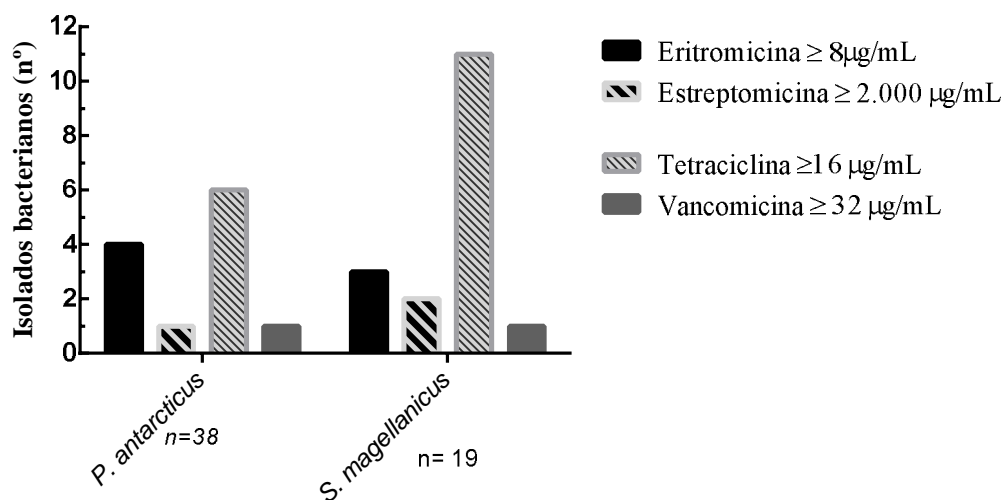


Figura 10. Amostras de *P. antarcticus* e *S. magellanicus* com presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos testados.

As espécies dos isolados resistentes foram identificadas pelo sequenciamento da região hipervariável V1-V2 do rRNA 16S bacteriano; esses isolados também foram triados para genes de resistência comumente associados às bactérias resistentes aos antimicrobianos eritromicina, tetraciclina e vancomicina (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Espécies bacterianas e genes de resistência (e *int*) presentes nas amostras de *P. antarcticus*.

Isolados resistentes (amostra)	CIM (µg/mL)	Gene ¹			
		<i>erm(B)</i>	<i>int</i>	<i>tet(M)</i>	<i>van(B)</i>
Eritromicina					
<i>Staphylococcus aureus</i> (Pa 21)	60	-	-		
<i>Staphylococcus aureus</i> (Pa 18)	125	-	-		
<i>Staphylococcus aureus</i> (Pa 24)	125	-	-		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Pa 26)	> 500	-	-		
Estreptomicina					
<i>Enterococcus faecalis</i> (Pa 12)	> 6.000				
Tetraciclina					
<i>Enterococcus faecalis</i> (Pa 21)	32		+	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (Pa 22)	32		+	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> (Pa 26)	16		+	+	
<i>Serratia marcescens</i> (Pa 27)	32		-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> (Pa 20)	62		-	-	
<i>Citrobacter freundii</i> (Pa 43)	124		-	-	
Vancomicina					
Não identificada (Pa 23)	> 500				+

¹ As células em branco indicam que a PCR não foi realizada, pois o gene não responderia pela resistência.

Tabela 4. Espécies bacterianas e genes de resistência (e *int*) presentes nas amostras de *S. magellanicus*

Isolados resistente (amostra)	CIM (µg/mL)	Gene ¹			
		<i>erm(B)</i>	<i>int</i>	<i>tet(M)</i>	<i>van(B)</i>
Eritromicina					
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sm17)	250	-	-		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Sm 8)	> 500	-	-		
Bactéria não cultivável (Sm6)	250	-	-		
Estreptomicina					
<i>Serratia marcescens</i> (Sm13)	> 6.000				
Sem similaridade (Sm2)	> 6.000				
Tetraciclina					
<i>Enterococcus faecium</i> VRE (Sm15)	62		-	+	
<i>Enterococcus faecium</i> VRE (Sm18)	62		-	+	
<i>Enterococcus faecium</i> (Sm17)	62		-	+	
<i>Serratia marcescens</i> (Sm10)	62		-	+	
<i>Serratia marcescens</i> (Sm13)	62		-	-	
<i>Serratia marcescens</i> (Sm14)	62		-	-	
<i>Escherichia coli</i> APEC 018 (Sm16)	62		-	-	
<i>Escherichia coli</i> (Sm19)	62		-	+	
<i>Vagococcus fluvialis</i> (Sm8)	8		-	-	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Sm11)	8		-	-	
<i>Citrobacter freundii</i> (Sm12)	124		-	-	
Vancomicina					
Não identificada (Sm7)	> 500				-

¹ As células em branco indicam que a PCR não foi realizada, pois o gene não responderia pela resistência.

Como mostram as Tabelas 3 e 4, o antimicrobiano que apresentou o maior número de bactérias resistentes foi a tetraciclina, seguido da eritromicina, tanto nas amostras de *P. antárticas* como as de *S. magellanicus*. Da mesma forma, o gene de resistência mais recorrente em ambas as amostras foi o *tet(M)*, seguido de *int* e *van(B)*. Por outro lado, a presença de *erm(B)* não foi identificada em nenhuma das amostras resistentes à eritromicina. Das seis bactérias de *P. antarcticus* resistentes à tetraciclina, três possuem os genes *tet(M)* e *int*. Das 11 bactérias de *S. magellanicus* resistentes à tetraciclina, quatro possuem a presença do gene *tet(M)*. A amostra de *P. antarcticus* resistente à vancomicina possui o gene *van (B)*, porém a de *S. magellanicus* não o possui (Tabela 4).

Houve, no total, a identificação de sete gêneros e de nove espécies bacterianas resistentes aos antimicrobianos testados, sendo *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. os gêneros mais recorrentes (sete ocorrências cada), seguido de *Serratia* sp. (cinco ocorrências), *Escherichia* sp. (duas ocorrências), *Citrobacter* sp. (duas ocorrências), *Vagococcus* sp. e *Aeromonas* sp. (uma ocorrência em ambas). Também houve a identificação de uma amostra sem similaridade com nenhuma sequência disponível no banco de dados BLAST e duas que não tiveram seu rRNA 16S sequenciado.

Os gêneros bacterianos mais recorrentes são gram-positivos, o que está de acordo com a identificação inicial das amostras (Fig. 6) e com outros trabalhos, em que o filo Firmicutes foi um dos mais abundantes na microbiota de quatro espécies de pinguins antárticos, incluindo o pinguim gentoo (DEWAR *et al.*, 2013).

Enterococcus sp. foi o gênero mais identificado nos isolados resistentes, sendo resistente à estreptomicina e tetraciclina, majoritariamente. Este gênero já

foi identificado em amostras de fezes de pinguins antárticos em outros trabalhos (BANKS; CARY; HOGG, 2009) e também o filo ao qual pertence é um dos mais abundantes na microbiota de pinguins (DEWAR *et al.*, 2013). *Enterococcus* sp resistente a diversos antimicrobianos está recorrentemente associado à microbiota de frangos de corte (LU *et al.*, 2003; NILSSON, BENGTTSSON, VÅGSHOLM, 2013; TZAVARAS *et al.*, 2012).

As bactérias isoladas da microbiota dos *P. antarcticus* e *S. magellanicus* apresentaram maior resistência à tetraciclina em comparação aos outros antimicrobianos. Este resultado está de acordo com um trabalho que já identificou bactérias resistentes à tetraciclina em amostras de fezes de pinguim-de-adélia (*P. adeliae*), juntamente com o gene *tet(M)* (RAHMAN *et al.*, 2008).

Os genes de resistência mais recorrentes foram *tet(M)* e *int*, de acordo com o perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas, pois a resistência à tetraciclina foi maior em ambas as espécies de pinguins e o gene *int* codifica a integrase do transposon da família Tn916, que, muitas vezes carrega o gene *tet(M)*, e também *erm(B)*. Como seria de se esperar, estes genes não foram identificados em todas as bactérias resistentes a tetraciclina, então é possível inferir que a resistência a este antimicrobiano esteja ligada a outros genes que conferem resistência, mas que não foram testados neste trabalho. O mesmo pode ter ocorrido com as amostras resistentes aos outros antimicrobianos.

Os dados do isolamento de bactérias resistentes mostram que foram isoladas proporcionalmente mais bactérias resistentes de amostras de pinguins-de-magalhães (15/19; ou 79%) do que de pinguins antárticos (10/38 + 6; ou 23%). Essa diferença pode ser explicada por ao menos uma ou ambas de duas

hipóteses. A primeira é que as bactérias dos pinguins antárticos foram isoladas de fezes congeladas e, devido à baixa temperatura, os micro-organismos cultiváveis presentes na amostra podem não ter suportado tal temperatura. Já as bactérias oriundas dos pinguins-de-magalhães, ao contrário, foram isoladas de suabes cloacais, que, devido ao meio de armazenamento, permitiu um primeiro enriquecimento da amostra, preservando assim as bactérias cultiváveis presentes na microbiota intestinal desses pinguins.

A segunda explicação seria que *S. magellanicus* habitam áreas já habitadas por seres humanos e essa coabitação implica no compartilhamento da microbiota ambiental (DOUGNAC *et al.*, 2015). Inclusive, já foi identificado que cepas isoladas de *S. magellanicus*, como *Salmonella enterica* Enteritidis, possuem alta similaridade genética com outras cepas isoladas de humanos e frangos de corte (DOUGNAC *et al.*, 2015). O fato de ser identificado majoritariamente resistência bacteriana a tetraciclina na microbiota de pinguins-de-magalhães também corrobora a hipótese de que essa resistência seja influenciada pelo impacto humano, pois este antimicrobiano é utilizado recorrentemente na clínica humana e em animais de criação.

No ambiente antártico, onde se encontram os pinguins antárticos, o isolamento de bactérias resistentes pode indicar que este ambiente pode estar recebendo genes de resistência a antimicrobianos decorrente da atividade humana local, mesmo que pouca, ou remotamente, oriunda de ambientes de maior atividade humana, como pela contaminação de rios e oceanos com o esgoto, derivado da atividade antrópica (DOUGNAC *et al.*, 2015).

Outra possibilidade, a resistência observada pode ser uma resistência natural, não necessariamente causada pela interação com o homem, como mencionado na seção 1.2.1.

A presença comparativamente baixa de isolados resistentes a antimicrobianos corrobora a premissa inicial deste projeto, de que a microbiota de animais que habitam o ambiente antártico pode ser usada como parâmetro para a resistência natural presente na microbiota de aves.

4.3 Identificação de genes de resistência no DNA total de fezes de pinguins antárticos

A quantidade de DNA extraído das amostras variou entre 0,4 ng/μL e 213,7 ng/μL. As amostras de *P. papua* renderam maior quantidade de DNA do que as de *P. antarcticus*, provavelmente porque as amostras da primeira espécie eram pastosas e as da segunda eram fibrosas.

Foi possível extrair DNA de 25 amostras de *P. antarcticus* e de oito amostras de *P. papua*, a julgar pelo fato que o DNA extraído permitiu a amplificação do rRNA 16S, que confirma a integridade do DNA. Essas amostras de DNA total foram então triadas para a presença dos genes *erm(B)*, *tet(M)*, *int* e *van(B)*. Nas amostras de ambas as espécies de pinguins, o gene mais abundante foi o *int*, seguido de *tet(M)*; ao passo que os genes *van(B)* e *erm(B)* foram encontrados em apenas uma amostra de *P. antarcticus* e *P. papua*, respectivamente (Fig. 11).

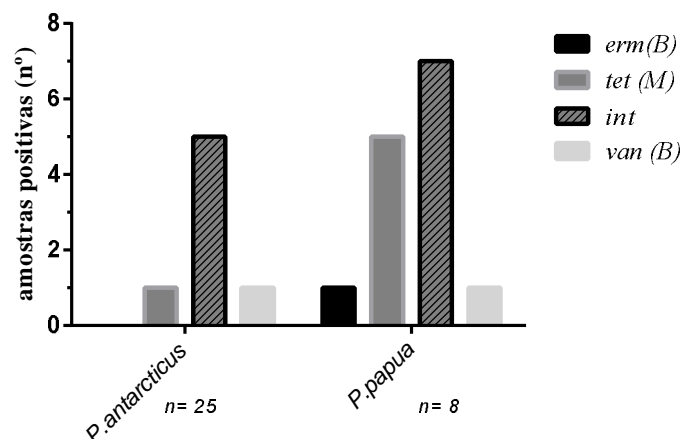


Figura 11. Presença dos genes de resistência no DNA total de amostras de fezes de *P. antarcticus* e *P. papua*.

As amostras de *P. antarcticus* que foram positivas para os genes de resistência testados foram as seguintes: Pa1 positiva para *tet(M)*; Pa1, Pa16, Pa23, Pa30 e Pa41 positivas para *int*, e Pa38 positiva para *van(B)*.

De acordo com nossos dados mostrados na Tabela 3, deveríamos amplificar os genes *tet(M)* e *int* das amostras Pa21, Pa22 e Pa26 e o gene *van(B)* da amostra Pa23. Porém, ao passo que não conseguimos isolar DNA da amostra Pa21, não conseguimos amplificar esses genes a partir do DNA total das demais amostras. Uma explicação possível é que o DNA da bactéria isolada, positiva para os genes de resistência, estaria numa concentração muito pequena no DNA total, e a detecção da resistência teria sido possível apenas após o enriquecimento das bactérias resistentes em caldo BHI. Esses resultados levantam uma preocupação a respeito da representatividade obtida no DNA total.

Nenhuma bactéria isolada das amostras de *P. papua* foi resistente aos antimicrobianos testados, porém, foram identificados genes de resistência a antimicrobianos no DNA total das amostras dessa espécie (Fig.11). Esse dado sugere que os genes de resistência encontram-se na microbiota da fração não-enriquecida ou não cultivável de *P. papua*.

Não foi realizada a extração do DNA total de amostras de *S. magellanicus* porque eram suabes, e embora suabes sejam um meio para transporte, já promovem um crescimento da fração cultivável e, portanto, uma alteração da amostra inicial.

A grande ocorrência de *int* deixa claro a dinâmica do transposon e sua presença não está necessariamente vinculada à presença de *tet(M)* ou *erm (B)*. Em relação ao *tet(M)*, a sua presença neste trabalho apresentou-se baixa, porém, quando encontrados em ambientes remotos, é possível que esta resistência venha através de forças físicas da natureza (como a corrente dos oceanos) ou ainda do ambiente, considerada resistência natural. Pouco se sabe sobre a resistência a antimicrobianos no continente antártico, porém em outro estudo (RAHMAN *et al.*, 2008) foram identificados dois diferentes genótipos de *tet(M)* provenientes de bactérias de suabe cloacal de *P. adeliae*, que habitam a baía de Lutzaw-Holm, Antártida (69°S 039°E).

Como citado anteriormente (item 1.2.1), uma fração importante da microbiota de animais é composta de bactérias não cultiváveis nas condições laboratoriais, e essa fração não cultivável pode carregar genes de resistência, como já foi observado por Sommer e colaboradores (2009). Levando isso em consideração, optamos por fazer a extração do DNA das fezes de pinguins para

obtermos DNA de todos os micro-organismos presentes, independentemente de serem ou não cultiváveis. A triagem do DNA total de cada amostra para genes de resistência pode revelar a presença de genes que não foi detectada nas bactérias resistentes eventualmente recuperadas no crescimento em caldo BHI.

Este trabalho não teve a pretensão de identificar novos genes de resistência, que exigiria outra abordagem, mas triar o DNA total para genes já descritos. Até o momento, foi triado apenas um gene de resistência para glicopeptídeos, tetraciclinas e macrolídeos, tanto nas bactérias resistentes isoladas como no DNA total. Como perspectiva, essas amostras deverão ser triadas para um número maior de genes de resistência, à medida que forem obtidos os controles positivos para genes menos frequentes.

5. CONCLUSÕES

O objetivo desta dissertação foi avaliar a resistência a antimicrobianos presentes em bactérias provenientes da microbiota intestinal dos pinguins antárticos pinguim-de-barbicha (*P. antarcticus*) e pinguim gentoo (*P. papua*) e compará-las com a resistência presente na microbiota intestinal de pinguins-de-magalhães (*S. magellanicus*).

Foi identificado que as bactérias provenientes da microbiota intestinal de *P. antarcticus* e de *P. papua* são, em sua maioria, gram-positivas, ao contrário de *S. magellanicus*, cuja maioria é gram-negativa. Esse contraste pode estar relacionado ao fato de que esses gêneros de pinguins possuem diferenças na sua interação com o ambiente em que vivem.

De acordo com os resultados, a resistência bacteriana aos antimicrobianos testados foi maior na fração enriquecida em caldo BHI da microbiota intestinal de pinguins-de-magalhães do que dos pinguins antárticos. Nem todos os isolados resistentes apresentaram genes de resistência, isso pode significar que eles possuem outros genes de resistência que não foram triados nesta dissertação.

Foi identificado que há mais genes de resistência a antibióticos nas amostras de DNA total de *P. papua* do que de *P. antarcticus*, e que o gene mais recorrente foi o gene que codifica um transposon para carrear o gene para resistência a tetraciclina. Essa identificação nos possibilita entender que pinguins antárticos, mesmo com pouco contato com humanos, possuem genes de resistência para antimicrobianos utilizados na clínica médica e veterinária. Este dado pode ser um indicativo da presença natural de genes de resistência encontrados em bactérias

provenientes da microbiota intestinal de pinguins. As informações fornecidas neste trabalho corroboram com os objetivos da dissertação.

6. BIBLIOGRAFIA

- BANKS, J. C.; CARY, S. C.; HOGG, I. D. The phylogeography of Adelie penguin faecal flora. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 577-588, mar. 2009.
- BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, v. 400, n. 1-3, p. 212-226, 1 ago. 2008.
- BHULLAR, K. *et al.* Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *Plos One*, v. 7, n. 4, p. e34953, 11 abr. 2012.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. IUCN Red List for birds. (<http://www.birdlife.org>) . Acessado em 17/01/2017 .
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and the Clinical Laboratory. (<https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/vreclinical-laboratory.html>). Acessado em 18 de fevereiro de 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- _____. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.
- CROXALL, J.P., Trathan, P.N., Murphy, E.J., 2002. Environmental change and Antarctic seabird populations. *Science (New York, N.Y.)* 297, 1510-1514.
- D'COSTA, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, v. 477, n. 7365, p. 457-461, 31 ago. 2011.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALLI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, v. 449, n. 7164, p. 811-818, 18 out. 2007.
- DEWAR, M. L. *et al.* Influence of fasting during moult on the faecal microbiota of penguins. *Plos One*, v. 9, n. 6, p. e99996, 30 jun. 2014.
- _____. *et al.* Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. *MicrobiologyOpen*, v. 2, n. 1, p. 195-204, fev. 2013.
- DOUGNAC, C. *et al.* Detection of Salmonella enterica in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) of Chilean Patagonia: evidences of inter-species transmission. *Epidemiology and Infection*, v. 143, n. 6, p. 1187-1193, abr. 2015.

FLUIT, A. *et al.* High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* blood culture isolates from 23 European university hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 21, p. 357-359, 2003.

GHOLIZADEH, Y.; COURVALIN, P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16 Suppl 1, p. S11-7, nov. 2000.

GILMORE, MICHAEL S; CLEWELL, D. B. I. Y. S. N. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>>.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. (www.iucnredlist.org). Acessado em 17 de janeiro de 2017.

IWERIEBOR, B. C.; OBI, L. C.; OKOH, A. I. Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. *BMC Microbiology*, v. 15, p. 136, 4 jul. 2015.

KHAN, S. A. *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19, n. 1, p. 27-34, fev. 2005.

JUNG, A.; RAUTENSCHLEIN, S. Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC veterinary research*, v. 10, p. 311, 24 dez. 2014.

LEENER EDE, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F. Genes , and Tn 1545 -like Transposons in Macrolide- and. Microbial drug resistance. 2004;10(4).

LIN J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2015 Feb 5;6:34.

LU, J. *et al.* Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

LYNCH, W., 1997. Penguins of the world. Firefly Books, Buffalo, New York, United States.

MACOVEI, L.; ZUREK, L. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 6, p. 4028-4035, jun. 2006.

MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, p. 209-215, 2001. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>

MCARTHUR AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3348–3357.

MMA Ministério do Meio Ambiente. 2007. O Brasil e o Meio Ambiente Antártico. Brasília: 140 p.

MICOL, T., Jouventin, P., 2001. Long-term population trends in seven Antarctic seabirds at Pointe Geologie (Terre Adelie) - Human impact compared with environmental change. *Polar Biology* 24, 175-185.

MU Q, Li J, Sun Y, Mao D, Wang Q, Luo Y. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015 May;22(9):6932–6940.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):727–737.

MURRAY, P.R. e cols. *Microbiologia Médica.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NELSON, R. R. Intrinsically vancomycin-resistant gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. *The Journal of Hospital Infection*, v. 42, n. 4, p. 275-282, ago. 1999.

NGUYEN, F. *et al.* Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, v. 395, n. 5, p. 559-575, maio 2014.

NILSSON, O.; VÅGSHOLM, I.; BENGTTSSON, B. Proof of concept for eradication of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from broiler farms. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 55, p. 46, 11 jun. 2013.

OLIVEIRA, R.M.S., Hilario, C.J.R., Fausto, I.V., Santos, D.C., Brusco, G.M., Tavares, M. 2010. Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) recebidos pelo CERAM (CECLIMAR/IB/UFRGS) entre 1998 e 2009. In: SABMar.

PECHÈRE JC. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18 Suppl 1:S25–8.

PISSETTI, Caroline. *Influência de antimicrobianos na ração de suínos criados com diferentes níveis de medicação sobre resistência de Escherichia coli e perfil da microbiota intestinal.* 2016. 100f. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Veterinária- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

POTTI, J. *et al.* Bacteria divert resources from growth for magellanic penguin chicks. *Ecology Letters*, v. 5, n. 6, p. 709-714, nov. 2002.

RAHMAN, M. H. *et al.* Occurrence and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enteric bacteria of Antarctic Adelie penguins. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 3, p. 627-628, set. 2008.

SANDER, M., Castro, A.G.S.d., Costa, E.S., Santos, C.s.R.d., 2004. Aves Antárticas e Patagônia registradas no litoral norte do Rio Grande do Sul – Brasil durante o período de maio de 2002 a maio de 2003.

SANFORD, J. C. *et al.* Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1494-1502, abr. 2001.

SCHERER, J.d.F.t.M., Scherer, A.L.s., Petry, M.V., 2011. Ocorrência de carcaças de aves marinhas no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia* 19, 505-513.

SHAKIL, S. *et al.* Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science*, v. 15, n. 1, p. 5-14, jan. 2008.

SOMMER, M. O. A.; DANTAS, G.; CHURCH, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, v. 325, n. 5944, p. 1128-1131, 28 ago. 2009.

SPLICHALOVA P, Svec P, Ghosh A, Zurek L, Oravcova V, Radimersky T, et al. Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 May;107(5):1281–1289.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 3, p. 419-431, fev. 2010.

_____, Waglechner N, Wright GD. Antibiotic resistance-mediated isolation of scaffold-specific natural product producers. *Nat Protoc*. 2014 May 29;9(6):1469–1479.

TRZCINSKI, K. *et al.* Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 763-770, jun. 2000.

TEIXEIRA, I.M.n., Mello, R.m.J.F.B., Oliveira, M.M.d., Nascimento, J.o.L.d., 2010. Projeto Nacional de Monitoramento do PINGUIM-DE-MAGALHÃES *Spheniscus magellanicus*. ICMBio, Brasília.

TRZCINSKI, K. *et al.* Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 763-770, jun. 2000.

TZAVARAS, I. *et al.* Diversity of vanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from broilers, poultry slaughterers and hospitalized humans in Greece. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 8, p. 1811-1818, ago. 2012.

VOOREN, C.M., Brusque, L.F., 1999. As Aves do Ambiente Costeiro do Brasil: Biodiversidade e Conservação, Vol 1. FUNBIO, Rio de Janeiro, 139 p.

WOEHLER, E.J., Croxall, J.P., 1997. The status and trends of Antarctic and sub-Antarctic seabirds. *Marine Ornithology* 25, 43-66.

WOODFORD, N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microbial Drug Resistance*, v. 7, n. 3, p. 229-236, 2001.

WRIGHT, G. D.; THOMPSON, P. R. Aminoglycoside Phosphotransferases: Proteins, Structure, And Mechanism *Frontiers in Bioscience* 4, d9-21, January 1, 1999.

WRIGHT GD. Antibiotics: a new hope. *Chem Biol.* 2012 Jan 27;19(1):3–10.

ZHANG, X.-X.; ZHANG, T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 7, p. 2598-2604, 1 abr. 2011.

7. APÊNDICE

Apêndice 1. Resumo apresentado no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia (18 a 22 de Outubro de 2015- Florianópolis, SC, Brasil)

Title: ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM THE MICROBIOTA OF THE ANTARCTIC PENGUINS PYGOSCELIS PAPUA AND P. ANTARCTICUS **Autors** Klemberg, V.S¹, Petry, M.V², Cardoso, M.R.I¹, Horn.F1 **Institution** ¹ UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Avenida Bento Gonçalves, 1500, Porto Alegre-RS), Unisinos²

(Universidade do Vale dos Sinos, Avenida Unisinos, 950-Cristo Rei, São Leopoldo-RS).

Abstract:

Antarctic seabird populations have been much studied as bioindicators of the nature variability in the Southern Ocean marine ecosystems. Among the Antarctic seabirds, the most abundant are seven penguin species, which includes the three species of the genus *Pygoscelis*. *Pygoscelis adeliae*, *P. antarcticus* and *P. papua* have colonies in the South Shetland Islands, and although their populations have been disturbed by human activities, such as scientific research and tourism, they remain among the wild birds with least contact with humans. Thus, their microbiota may serve as indicators of antimicrobial resistance in the environment. The goal of our project is to evaluate the antimicrobial resistance present in the microbiota of the forementioned penguin species. For that, we have collected samples of apparently fresh feces from *P. papua* (n = 12) and from *P. antarcticus* (n = 46) in their respective colonies located in the Elephant Island in December 2014. Samples were stored in natura at -20°C during transport and then at -80°C until use. We could observe mainly gram-positive bacillus but also a smaller proportion of gram-negative bacillus in one sample of *P. papua* feces cultivated in BHI broth at 37°C overnight, and this culture yielded lactose-fermenting colonies in MacConkey agar. Surprisingly, however, we have been unable to isolate gram-negative microorganisms from *P. antarcticus* feces. We have so far analyzed 10 samples, and rare gram-negative bacillus could be observed in BHI broth O/N cultures of *P. antarcticus* feces. Likewise, we could observe only gram-positive cocci and gram-positive bacillus in feces in natura. We have also cultivated *P. antarcticus* feces in BHI broth supplemented with crystal violet (0.001 mg/ml) in order to inhibit growth of gram-positive microorganisms. Again,

this culture yielded no colonies in MacConkey agar, although gram-positive cocci grew in LB agar. Next summer, we plan to collect samples from *P. antarcticus* feces from colonies not only in Elephant Island but also in Penguin and Livingston Islands. Analyses of these samples will reveal if the virtual lack of gram-negative bacteria is a characteristic of *P. antarcticus* microbiota or if it was only a fluctuation. Thus, *P. papua* microbiota may be used to screen for gram-positive and gram-negative resistance genes, but this possibility remains to be confirmed for *P. antarcticus*.

Keywords: Penguins, bacteria, microbiota, *P.papua*, *P.antarcticus*.

Apêndice 2. Resumo apresentado no 23º Congresso Latino- americano de Microbiologia e Congresso Argentino de Microbiologia (ALAM- CAM 2016).
Rosário/SF, Argentina

Title: ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM THE MICROBIOTA OF THE ANTARCTIC PENGUINS PYGOSCELIS PAPUA AND P. ANTARCTICUS **Autors** Klemberg, V.S¹, Petry, M.V², Cardoso, M.R.I¹, Horn.F¹ **Institution** ¹ UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Avenida Bento Gonçalves, 1500, Porto Alegre-RS), Unisinos² (Universidade do Vale dos Sinos, Avenida Unisinos, 950-Cristo Rei, São Leopoldo-RS)

Abstract:

Antarctic seabird populations have been much studied as bioindicators of the nature variability in the Southern Ocean marine ecosystems. Among the Antarctic seabirds, the most abundant are seven penguin species, which includes the three species of the genus *Pygoscelis*. *Pygoscelis adeliae*, *P. antarcticus* and *P. papua* have colonies in the South Shetland Islands, and although their populations have been disturbed by human activities, such as scientific research and tourism, they remain among the wild birds with least contact with humans. Thus, their microbiota may serve as indicators of antimicrobial resistance in the environment. The goal of our project is to evaluate the antimicrobial resistance present in the microbiota of the forementioned penguin species. For that, we have collected samples of apparently fresh feces from *P. papua* (n = 12) and from *P. antarcticus* (n = 46) in their respective colonies located in the Elephant Island in December 2014. Samples were stored in natura at -20°C during transport and then at -80°C until use. We could observe mainly gram-positive bacillus but also a smaller proportion of gram-negative bacillus in one sample of *P. papua* feces cultivated in BHI broth at 37°C overnight, and this culture yielded lactose-fermenting colonies in MacConkey agar. Surprisingly, however, we have been unable to isolate gram-negative microorganisms from *P. antarcticus* feces. We have so far analyzed 10 samples, and rare gram-negative bacillus could be observed in BHI broth O/N cultures of *P. antarcticus* feces. Likewise, we could observe only gram-positive cocci and gram-positive bacillus in feces in natura. We have also cultivated *P. antarcticus* feces in BHI broth supplemented with crystal violet (0.001 mg/ml) in order to inhibit growth of gram-positive microorganisms. Again, this culture yielded no colonies in MacConkey agar, although gram-positive cocci grew in LB agar. Next summer, we plan to collect samples from *P. antarcticus* feces from colonies not only in Elephant Island but also in Penguin and Livingston Islands. Analyses of these samples will reveal if the

virtual lack of gram-negative bacteria is a characteristic of P. antarcticus microbiota or if it was only a fluctuation. Thus, P. papua microbiota may be used to screen for gram-positive and gram-negative resistance genes, but this possibility remains to be confirmed for P. antarcticus.

Keywords: Penguins, bacteria, microbiota, P.papua, P.antarcticus.

CURRÍCULO VITAE

KLEMBERG, V.S

DADOS PESSOAIS

Nome: Vivian Souza Klemberg

Nascimento: 17 de abril de 1987, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: vivian.klemberg@gmail.com

FORMAÇÃO:

Bacharel em Biomedicina, Centro Universitário Metodista IPA (2010)

Especialização em Saúde Pública - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS (2013)

Mestrado em Biologia Celular e Molecular UFRGS (2017)

ESTÁGIOS

Toxilab Análises Clínicas, TOXILAB, Brasil.

2009 - 2010

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

2009 - 2009

Hospital Moinhos de Vento, HMV, Brasil.

2008 - 2008

Centro Universitário Metodista, IPA-RS, Brasil.

2008 - 2008

Bolsista de Iniciação Científica

Centro Universitário Metodista, IPA-RS, Brasil.

2006-2007

Monitora de Histologia e Embriologia

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL ANTERIOR

Casa Civil do Rio Grande do Sul

2011-2014

Toxilab Análises Clínicas, TOXILAB, Brasil.

2010 – 2011

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

KLEMBERG, V. S.; ROSA, R. S. ; ROCHA, C. F. A Atuação das Organizações Internacionais no Setor Saúde Brasileiro. In: 2º Congresso Brasileiro de Política, Planejamento e Gestão em Saúde, 2013, Belo Horizonte. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Política, Planejamento e Gestão em Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2013. v. 1. p. 1-20.

Resumos publicados em anais de congressos

KLEMBERG, V. S.; Lia Nunes de Avila Rudimar S. Riesgo ; Marcelo Zubaram Goldani ; Marlene Canarim Danesi ; Josiane Ranzan ; Pricila Sleifer ; Fleming Salvador Pedroso ; RUDIMAR, L. N. A. . ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL OCORRIDO NA INFÂNCIA. In: III SALÃO DE INCIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008, PORTO ALEGRE. Ciência em Movimento (Impresso). Porto Alegre-RS: Editora Universitária IPA, 2008. v. 1. p. 72-72.

KLEMBERG, V. S.; MEREGHALLI, R. T. ; PETRY, M. V. ; CARDOSO, M. R. I. ; HORN, F. . Antibiotic resistance in *Enterococcus* sp. isolated from the microbiota of Antarctic penguins *Pygoscelis papua* and *P. antarcticus*. 2016. (28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis/SC, Brasil. Outubro, 2015)

KLEMBERG, V. S.; PETRY, M. V. ; HORN, F. . Isolation of microorganisms from the microbiota of the Antarctic Penguins *Pygoscelys papua* and *Pygoscelys Antarcticus*. 2015. (23º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Congresso Argentino de Microbiologia. Rosário/ SF, Argentina. Setembro, 2016).

KLEMBERG, V. S.; ROCHA, C. F. . A Atuação de Organizações Internacionais no Setor Saúde no Brasil. 2013. (Congresso Latino Americano de Epidemiologia y Salud Pública. Granada/Andaluzia, Espanha, 2013).

ALMEIDA,G ; LACERDA,D ; **KLEMBERG, V. S.** ; GUERA,R.B ; NORMANN,C.A.B.M ; GOMEZ,R ; COITINHO,A.S ; FREITAS, ; FUNCHAL,C.S . Effect of acute treatment with 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-2-en-1-one on frontal cortex of immature rats. 2010. (Meeting Of The Brazilian Society For Cell Biology. São Paulo, SP. Brasil, 2010).

KLEMBERG, V. S.; GUERA,R.B ; FUNCHAL,C.S ; NORMANN,C.A.B.M . Histological Evaluation of rats seminiferous tubules and possible gametogenic

issues caused by different selenium concentrations. 2010. (Meeting Of The Brazilian Society For Cell Biology. São Paulo, SP. Brasil., 2010).

KLEMBERG, V. S.; FUNCHAL,C.S ; GUERA,R.B ; NORMANN,C.A.B.M . Efeito do 3-butil-1-fenil-2-(fenilselênio)-oct-en-ona sobre a organização histológica dos túbulos seminíferos de ratos Wistar em dose aguda. 2009. (IV Salão de iniciação Científica e Extensão. Porto Alegre/RS, Brasil 2009).

KLEMBERG, V. S.; RUDIMAR, L. N. A. ; RANZAN,Josiane ; SLEIFER,P. ; GOLDANI,M.Z ; Riesgo ; PEDROSO, F .S . A linguagem no Acidente Vascular Ocorrido na Infância. 2008. (IV Salão de iniciação Científica e Extensão, Porto Alegre/RS, Brasil-2008).

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

XXIII Congresso Latino Americano de Microbiologia. Antibiotic resistance in *Enterococcus* sp. isolated from the microbiota of Antarctic penguins *Pygoscelis papua* and *P. antarcticus*. 2016. (Congresso).

28º Congresso Brasileiro De Microbiologia. Isolation Of Microorganisms From The Microbiota Of The Antarctic Penguins *Pygoscelis Papua* and *P. Antarcticus*. 2015. (Congresso).

Congresso Latino Americano de Epidemiologia y Salud Pública. A Atuação de Organizações Internacionais no Setor Saúde no Brasil. 2013. (Congresso).

Conferência Estadual sobre Transparência e Controle Social-. 2012. (Outra).

Seminário internacional sobre Enfrentamento à Corrupção. 2011. (Seminário).

Metting Of The Brazilian Society For Cell Biology. Effect of acute treatment with 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-2-en-1-one on frontal cortex of immature rats. 2010. (Congresso).

Metting Of The Brazilian Society For Cell Biology. Histological Evaluation of rats seminiferous tubules and possible gametogenic issues caused by different selenium concentrations. 2010. (Congresso).

IV Salão de iniciação Científica e Extensão-2009 Um espaço para socializar e construir conhecimento.Efeito do 3-butil-1-fenil-2- (fenilselênio)oct-em-1-ona sobre a organização dos túbulos seminíferos de ratos Wistar em dose aguda. 2009. (Outra).

III Curso de Pesquisa Clínica- Desenvolvendo Referências para o Futuro da Pesquisa Clínica. 2008. (Oficina).

III Salão de Iniciação Científica e Extensão- um espaço para gerar conhecimento.A Linguagem no Acidente Vascular Cerebral Ocorrido na Infância. 2008. (Outra).

Programa de Extensão em Identificação Humana pelo DNA: Genética Forense. 2008. (Oficina).

14º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde Mercosul- Semana Científica do HCPA. 2007. (Congresso).

14º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde Mercosul- Semana Científica do HCPA- Seminário Centro De Pesquisas-Grupo De Trabalho De Humanização. 2007. (Seminário).

II Simpósio da Liga do Câncer da FFFCMPA- Neoplasias Ginecológicas. 2007. (Simpósio).

6º Mutirão da Saúde da Comunidade- Hospital Parque Belém.Projeto Educação Sexual na comunidade. 2005. (Oficina).

1º Curso De Manipulação Genética.- Hospital de Clínicas de Porto Alegre- 2005. (Oficina).