

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

ROSANA THALIA MEREGALLI

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA MICROBIOTA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE E PINGUINS: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Porto Alegre

2019

ROSANA THALIA MEREGALLI

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA MICROBIOTA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE E PINGUINS: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, pelo Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul – UFRGS

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Horn

Porto Alegre
2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e às minhas irmãs, por comemorarem comigo cada pequena conquista, por todo o apoio, incentivo e abdições para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus avós e tios, por todo o zelo e atenção a mim dedicados.

Ao Rodrigo, pelo carinho, paciência e por compreender minhas ausências.

Às minhas amigas e aos meus amigos da FacFar, por todos os momentos vividos dentro e fora dos muros da faculdade. Sou mais feliz tendo vocês na vida.

Ao Diretório Acadêmico da Faculdade de Farmácia (DAFF), pela oportunidade de viver o movimento estudantil e por contribuir tanto para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus amigos de longa data, pelo suporte e compreensão durante o curso e realização deste trabalho. Aos meus amigos, Mateus, Marina e Murilo, obrigada por se fazerem presentes, sempre.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Vivian, Simone, João, Daniel, Tobias e Letícia, por tantos aprendizados, pelas boas conversas e momentos compartilhados.

À minha orientadora, Fabiana, pela confiança e incentivo na realização deste trabalho, bem como pelo convívio e apoio durante todo o tempo.

RESUMO

A resistência a antimicrobianos é um dos maiores problemas de saúde pública. Antimicrobianos são usados na produção animal no tratamento de doenças e como promotores de crescimento. No Brasil, antimicrobianos de uso clínico humano e veterinário não são permitidos como promotores de crescimento. Frangos de corte são aves que, além de receberem tratamento com antimicrobianos também têm maior contato antrópico, portanto o objetivo deste trabalho é comparar com a resistência que pode ser encontrada na microbiota intestinal de aves selvagens, que não são tão impactadas pela ação antropogênica, assim como não são tratadas com antimicrobianos. Em trabalho anterior do grupo, foi avaliada a presença de bactérias resistentes na microbiota intestinal de 3 espécies de pinguins: *Pygoscelis antarcticus*, *P. papua* e *S. magellanicus*. Os pinguins antárticos estão entre as aves marinhas de menor contato com a ação humana direta, portanto o perfil de resistência a antimicrobianos encontrado em suas fezes pode servir como parâmetro para a resistência encontrada nas fezes de frangos de corte. Foram coletadas amostras de fezes de 39 frangos de corte em aviários do Rio Grande do Sul, em 2016, pela equipe do Dr. Benito G. de Brito (Fepagro - RS). As amostras foram cultivadas em ágar LB na presença dos 4 antimicrobianos (eritromicina, vancomicina, tetraciclina e estreptomicina), em concentrações pré-estabelecidas para *Enterococcus sp.* de acordo com o CLSI (CLSI, 2016). As amostras que cresceram na triagem na presença dos antimicrobianos foram submetidas ao protocolo de Concentração Inibitória Mínima para cada antimicrobiano testado. Foi realizada triagem para os genes de resistência *erm(B)*, *van(B)* e *tet(M)*, que codificam resistência à eritromicina, vancomicina e tetraciclina, respectivamente. A identificação das espécies bacterianas foi feita através do MALDI-TOF. Foram triadas todas as 39 amostras de fezes de frango de corte, sendo que destas, 24 cresceram em pelo menos um dos antimicrobianos. 21 amostras cresceram em eritromicina (8 µg/mL), 2 em vancomicina (32 µg/mL), 21 em tetraciclina (16 µg/mL) e 14 em estreptomicina (500 µg/mL). Para eritromicina, das 21 amostras que cresceram na triagem, obteve-se 30 isolados resistentes, todos apresentando CIM ≥ 500 µg/mL, e destes 30, 11 têm o gene de resistência *erm(B)*. Para vancomicina, das 2 amostras que cresceram, obteve-se 2 isolados resistentes, ambos com CIM > 250 µg/mL e o gene de resistência *van(B)*; para tetraciclina, das 21 amostras que cresceram na triagem, 31 isolados tiveram CIM > 31 µg/mL e, destes

31, 17 tiveram o gene *tet(M)*. Para estreptomicina, das 14 amostras que cresceram, obteve-se 14 isolados resistentes, todos com CIM \geq 500 $\mu\text{g/mL}$. Dentre as 38 amostras de fezes de pinguins antárticos, 9 amostras tiveram bactérias resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Dentre as 19 amostras de suabe cloacal de pinguins-de-magalhães, 13 apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Estes dados apontam para a exposição de pinguins-de-magalhães a resíduos antropogênicos no ambiente. Quanto à resistência encontrada nas amostras de fezes de frangos de corte, esta corrobora com a exposição destes animais a antimicrobianos e à ação humana.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Frangos de corte. Pinguins antárticos. Pinguins-de-magalhães.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a major public health problem. Antimicrobials are used in animal farming in the treatment of diseases and as growth promoters. In Brazil, antimicrobials for clinical human and veterinary use are not permitted as a growth promoter. Broilers are birds that, besides being treated with antimicrobials, also have more anthropic contact, therefore the goal of this study is to compare with the resistance that can be found in the gut microbiota of wild birds, which are not impacted by direct anthropic action and are not treated with antimicrobials. Antarctic penguins are among the seabirds with the least contact with direct human action, so the antimicrobial resistance profile found in the gut microbiota may be useful as a parameter for the resistance found in broilers. In a previous study, the presence of resistant bacteria in the gut microbiota of 3 penguin species was evaluated: *Pygoscelis antarcticus*, *P. papua* and *S. magellanicus*. Stool samples were collected from 39 broilers in poultry in Rio Grande do Sul, in 2016, by the team of Dr. Benito G. de Brito (Fepagro - RS). Samples were cultured on LB agar with 4 antimicrobials (erythromycin, vancomycin, tetracycline and streptomycin) at pre-established concentrations for *Enterococcus* sp. according to CLSI (CLSI, 2016). Samples who grew in the presence of antimicrobials were subjected to the Minimum Inhibitory Concentration protocol for each antimicrobial tested. Screening was done for resistance genes *erm(B)*, *van(B)* and *tet(M)*, which encode resistance to erythromycin, vancomycin and tetracycline, respectively. The identification of bacterial species was done through MALDI-TOF. All 39 samples of broiler feces were screened, of which 24 grew in at least one of the antimicrobials. 21 samples grew in erythromycin (8 µg/mL), 2 in vancomycin (32 µg/mL), 21 in tetracycline (16 µg/mL) and 14 in streptomycin (500 µg/mL). For 21 erythromycin samples that grew in antimicrobial screening, 30 resistant isolates were obtained, all with MIC ≥ 500 µg/mL, and of these 30, 11 had *erm(B)* gene. For vancomycin, from the 2 samples who grew at screening concentration, 2 resistant isolates were obtained, both with MIC > 250 µg/mL and the *van(B)*; for tetracycline, of the 21 samples that grew in the screening, 31 isolates had MIC > 31 µg/mL and of these 31, 17 had the *tet(M)* gene. For streptomycin, from the 14 samples that grew in the screening, 14 resistant isolates were obtained, all with MIC ≥ 500 µg/mL. From 38 samples of Antarctic penguins feces, 9 samples had bacteria resistant to at least one of the antimicrobials tested. From 19 swab cloacal samples of Magellanic penguins,

13 had resistance to at least one of the antimicrobials tested. We observed higher resistance in the fecal samples of broiler chickens and cloacal swabs of magellanic penguins than in the samples of Antarctic penguins feces. These findings indicate the exposure of magellanic penguins to anthropogenic residues in the environment. About the resistance found in broiler feces samples, this finding corroborates to the exposure of these animals to antimicrobials and human action.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Resistência a antimicrobianos	10
1.2 Antimicrobianos e a avicultura	11
1.3 Pinguins	13
1.3.1 <i>Pygoscelis antarcticus</i>	15
1.3.2 <i>Pygoscelis papua</i>	15
1.3.3 <i>Spheniscus magellanicus</i>	15
1.4 Antimicrobianos	16
1.4.1 Macrolídeos	16
1.4.2 Glicopeptídeos.....	17
1.4.3 Tetraciclinas.....	17
1.4.4 Aminoglicosídeos.....	18
2 OBJETIVO	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Amostras	21
3.2 Crescimento e isolamento dos microrganismos resistentes	21
3.3 Protocolo de Concentração Inibitória Mínima	21
3.4 Coloração de Gram	22
3.5 Extração de DNA	22
3.6 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos	22
3.7 Identificação das espécies bacterianas	23
3.8 Comparação entre os resultados das amostras de fezes de frangos de corte e os resultados das amostras de fezes de pinguins antárticos e suabes cloacais de pinguins-de-magalhães	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Crescimento e isolamento de microrganismos resistentes nas amostras de fezes de frangos de corte	25
4.2 Análise do fenótipo de resistência a antimicrobianos dos isolados resistentes em amostras de fezes de frangos de corte	25
4.3 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos	26
4.4 Identificação das espécies bacterianas	27

4.5 Comparação do número de amostras com isolados resistentes em pinguins e frangos de corte	28
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência a antimicrobianos

A descoberta dos antimicrobianos e seus respectivos usos na saúde humana e veterinária representa um dos maiores avanços da medicina na história, tornando-se uma das principais ferramentas para o desenvolvimento de intervenções complexas na era da medicina moderna (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Ao contrário de outros medicamentos, antimicrobianos acabam por precipitar sua própria obsolescência devido à seleção de microrganismos resistentes e, portanto, essa realidade se constitui em um desafio à descoberta de novos antibióticos (WRIGHT, 2010).

Sabe-se que a resistência a antimicrobianos é um fenômeno evolutivo que ocorre inevitavelmente, de forma natural (WRIGHT, 2010), pois genes de resistência a antimicrobianos estão presentes na natureza e em ambientes inóspitos, com pouca ou nenhuma influência antrópica (BHULLAR et al., 2012) antes mesmo do início de seu uso clínico (ALLEN et al., 2010). Cepas produtoras de antibióticos possuem genes que codificam resistência ao antibiótico que elas mesmo produzem (HOPWOOD, 2007) e esses genes podem ser encontrados no mesmo *cluster* que os genes da rota de biossíntese do antibiótico (MARTIN; LIRAS, 1989). Antibióticos produzidos por microrganismos na natureza podem exercer pressão seletiva sobre microrganismos de uma mesma comunidade ou habitat, porém é difícil mensurar as concentrações naturais de antibióticos presentes no solo ou na água, por exemplo, ou a extensão da pressão seletiva a qual os microrganismos estariam expostos (ALLEN et al., 2010). No entanto, sabe-se que, mesmo que a resistência a antimicrobianos ocorra naturalmente, o uso continuado e excessivo de antimicrobianos contribui para a seleção e disseminação de genes que conferem resistência aos mesmos, por meio de transferência vertical ou horizontal.

Uma vez que os antimicrobianos são essenciais para o tratamento de infecções na clínica humana e veterinária, é prioridade, em termos de saúde pública, preservar e garantir sua eficácia (ALLEN et al., 2010).

1.2 Antimicrobianos e a avicultura

Antimicrobianos são utilizados na produção animal no tratamento ou profilaxia de doenças e como promotores de crescimento, com variações de dose e forma de administração, dependendo do objetivo do uso. Na produção animal, em especial na avicultura, normalmente é mais eficiente fornecer o tratamento em grupos ou lotes de animais, através da administração do antimicrobiano na alimentação (ração) ou água. Essa forma de administração de medicamentos em massa chama-se metafilaxia, e é utilizada com o objetivo de tratar os animais doentes e ao mesmo tempo prevenir a infecção no grupo que não apresenta a doença. Também se faz uso da profilaxia antimicrobiana em períodos de maior risco de ocorrência de infecções (no transporte de animais, por exemplo) (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). Para tratamento, controle ou prevenção de infecções bacterianas, considera-se doses terapêuticas durante curto período de tempo (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2019). Para promotores de crescimento, considera-se o conceito de doses subterapêuticas, adicionadas à ração ou água, durante boa parte da vida do animal. Promotores de crescimento normalmente são administrados em baixas concentrações, variando de 2,5 a 125 mg/kg. Nos Estados Unidos, doses subterapêuticas adicionadas à alimentação correspondem a 200 gramas por tonelada de alimento, durante 12 semanas de “tratamento” (INSTITUTE OF MEDICINE, 1989).

Os antibióticos promotores de crescimento atuam controlando agentes prejudiciais ao trato digestivo, proporcionando efeitos benéficos à absorção de nutrientes (VASSALO; FIALHO; OLIVEIRA, 1997). A ação de antibióticos ocorre principalmente no lúmen intestinal (ALLIX, 2010). Microrganismos presentes nessa porção do intestino produzem substâncias tóxicas (como amônia, por exemplo) que causam irritação à parede intestinal, tornando-a mais espessa e suscetível a alterações morfológicas, devido a uma maior taxa de renovação celular (PARKER & ARMSTRONG, 1987). Observou-se que o peso do intestino de animais livres de microrganismos patogênicos era menor que o de animais convencionais. Segundo Henderickx (1981), e Anadón e Larrañaga (1999), a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento causa redução de bactérias patogênicas, tornando a parede intestinal mais fina devido à menor renovação de enterócitos e facilitando, por fim, a absorção de nutrientes. A redução da massa intestinal em animais que recebem promotores de crescimento resulta em maior disponibilidade de energia e

nutrientes para outros tecidos, melhorando o desempenho e produtividade (CROMWELL, 1999; ANADÓN; LARRAÑAGA, 1999).

O Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor mundial de carne de frango, tendo produzido 13,05 milhões de toneladas de carne de frango em 2017. Cerca de 67% dessa produção foi destinada ao consumo pelo mercado interno, atingindo uma média de 42,07 kg de carne de frango por pessoa por ano. Os estados da região Sul do Brasil são os principais responsáveis por essa produção, contribuindo com 64,35% da produção nacional (ABPA, 2018). Devido à organização da cadeia produtiva, o Brasil tem o menor custo de produção do frango, US\$ 0,44/kg, contra US\$ 0,55 dos EUA, US\$ 0,57 da Argentina, e US\$ 0,77 da França (ALVES; MARTINELLI; DEWES, 2006). Dentre os fatores que causam diminuição da produtividade e consequente aumento nos custos da avicultura brasileira estão as infecções bacterianas. A principal forma de controlar a morbidade e mortalidade causadas por infecções bacterianas é o tratamento com agentes antimicrobianos. Entre os antimicrobianos mais frequentemente usados com objetivo terapêutico na avicultura estão quinolonas, aminoglicosídeos, β -lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas (BORSOI, 2013).

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é bastante restrito no Brasil, tendo sido banidos atualmente os antimicrobianos usados na clínica humana e veterinária (como anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas, por exemplo) (MAPA, 2019). A exportação brasileira de carne de frango vem sofrendo com barreiras não-tarifárias sob a forma de restrição do uso de antimicrobianos na criação dos frangos de corte, impostas pelos países importadores, sob a alegação de que a principal razão para a emergência e disseminação de resistência antimicrobiana seria a pressão seletiva causada pela presença de antimicrobianos na microbiota e no ambiente. Considerando o contexto internacional, há uma forte pressão para o banimento do uso de melhoradores de desempenho no cenário da produção animal, com diversos países já tendo restringido ou abolido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. A União Europeia (UE) banuiu, em 2006, os antimicrobianos flavomicina e avilamicina, os últimos promotores de crescimento que ainda eram permitidos (ALLIX, 2010). Essa decisão afeta a produção dos principais países exportadores, pois estes precisam se adaptar às exigências dos países importadores. Com a possibilidade de restrição completa do uso de

antimicrobianos como promotores de crescimento (atualmente sendo usados principalmente ou exclusivamente para este fim, sem objetivos terapêuticos na saúde humana e veterinária), crescem as buscas por alternativas viáveis para o melhoramento de desempenho na produção, pois a retirada total de promotores de crescimento implica em abrupta redução de produtividade na avicultura brasileira (ALLIX, 2010). Diante deste cenário, a inserção de probióticos como aditivos alimentares vem mostrando-se promissora, não como substitutos, mas como alternativa ao uso de antimicrobianos promotores de crescimento (MACARI; FURLAN, 2005). Probióticos são, por definição, um suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de causar efeitos benéficos ao hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal; sua produção em larga escala deve ser viável, devem permanecer estáveis durante armazenamento e sobreviver na microbiota intestinal (FULLER, 1989).

A avicultura brasileira pode sofrer graves prejuízos em termos de produtividade sem um manejo adequado do uso (ou retirada) de antimicrobianos como promotores de crescimento (ALLIX, 2010). Faz-se necessário o esforço da cadeia produtiva em reduzir o uso de antimicrobianos na produção animal, assim como é importante obter dados sobre a resistência encontrada em bactérias isoladas da microbiota intestinal de frangos de corte, para ser possível inferir o quanto o uso de antimicrobianos na avicultura impacta na emergência e disseminação de genes de resistência, a partir do estabelecimento de uma linha de base como referência. Considerando que frangos de corte são aves que, além de receberem tratamento com antimicrobianos, também têm maior contato antrópico, o ideal é comparar com a resistência que pode ser encontrada na microbiota intestinal de aves selvagens, que não são impactadas pela ação antropogênica direta, assim como não recebem antimicrobianos como tratamento.

1.3 Pinguins

A Antártida é considerada o continente mais remoto do mundo e último lugar selvagem intocado pelo homem (BARGAGLI, 2008). Também é a região do planeta mais preservada, sendo realizados muitos esforços para que assim seja mantida, com a menor intervenção humana possível (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007).

As populações de aves antárticas vêm sendo estudadas e são consideradas indicadoras da qualidade do ecossistema marinho ao longo dos últimos 50 anos (MICOL; JOUVENTIN, 2001). Os pinguins são as aves marinhas antárticas que possuem maior representatividade ecológica e são consideradas espécies sentinelas de mudanças ambientais na Antártida. Eles representam 90% da avifauna da região antártica (CROXALL; TRATHAN; MURPHY, 2002). Os pinguins pertencem à família *Spheniscidae*, são aves marinhas não voadoras e que vivem a maior parte de sua vida dentro da água, indo para a terra apenas para reprodução e muda de pena. Os gêneros pertencentes à família *Spheniscidae* são: *Spheniscus* sp., *Pygoscelis* sp., *Aptenodytes* sp., *Eudyptes* sp., *Eudyptula* sp. e *Megadyptes* sp.. Os pinguins são encontrados apenas no hemisfério sul, habitando desde a Antártida e países da América do Sul, incluindo as Ilhas Galápagos, mas também África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (LYNCH, 2007). O trato gastrointestinal desses animais possui uma diversa e complexa microbiota, formada principalmente por bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Bacterioidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria (DEWAR et al., 2013, 2014) .

Ecossistemas marinhos são reservatórios de microrganismos de diversas origens, incluindo bactérias resistentes a antimicrobianos provenientes de ambientes com ação antropogênica (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008). Aves selvagens e aquáticas, migratórias em particular, podem percorrer grandes distâncias e habitar vários biomas, podendo disseminar genes de resistência por onde percorrerem. Quanto mais próximas à atividade humana, maior a probabilidade de encontrarmos bactérias resistentes a antimicrobianos em aves selvagens (ALLEN et al., 2010).

Os pinguins antárticos estão entre as aves marinhas menos suscetíveis à ação antrópica direta, por habitarem uma região do planeta praticamente intocada pelo homem. Isso sugere a possibilidade de que microrganismos de sua microbiota sirvam como indicadores da presença natural de genes de resistência a antimicrobianos na microbiota de aves e no ambiente em que ocorrem (KLEMBERG, 2017). Portanto, pinguins são aves selvagens cuja resistência a antimicrobianos presente na sua microbiota intestinal pode ser usada como referência da ocorrência e propagação de resistência a antimicrobianos na natureza.

1.3.1 *Pygoscelis antarcticus*

Os pinguins da espécie *Pygoscelis antarcticus* habitam colônias em diversas ilhas Antárticas, como as Ilhas Shetland do Sul, Geórgia do Sul, Órcades do Sul, Ilha Bouvet e Ilha Balleny (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019). De acordo com dados de 1999, a população mundial de *P. antarcticus* é formada por cerca de quatro milhões de pares reprodutores, amplamente distribuídos no continente antártico (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019).

1.3.2 *Pygoscelis papua*

Os pinguins da espécie *P. papua* se reproduzem principalmente no continente antártico, nas Ilhas Kerguelen, Ilhas Shetland do Sul, Ilha Geórgia e chegando também às Ilhas Malvinas (LYNCH, 2007). A população de *P. papua* apresenta cerca de 387 mil pares reprodutores (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019).

1.3.3 *Spheniscus magellanicus*

Os pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) se reproduzem em colônias distribuídas pela Argentina, Ilhas Malvinas e Chile. A população dessa espécie de pinguins é constituída por aproximadamente 1,4 milhões de pares reprodutores, e esse número está em declínio. *S. magellanicus* é classificado como espécie “ameaçada” pela International Union for the Conservation of Nature (IUCN) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019). Em contraste com os pinguins antárticos (*P. antarcticus* e *P. papua*), o pinguim-de-magalhães tem mais contato com ambientes submetidos à ação humana, devido a sua rota migratória em busca de alimento. Em 2008 registrou-se, no litoral brasileiro ao longo do ano, a presença de mais de 4.500 pinguins-de-magalhães vivos, ocupando desde o litoral gaúcho até o estado da Paraíba (SCHERER; SCHERER; PETRY, 2011). Durante a migração, alguns fatores têm sido apontados como particularmente importantes na morbidade e mortalidade dos pinguins-de-magalhães, como a contaminação dos oceanos com petróleo, a ingestão de detritos antropogênicos e as parasitoses gastrintestinais (MÄDER; SANDER; CASA JR., 2010).

1.4 Antimicrobianos

Os antimicrobianos usados neste trabalho foram escolhidos por atuarem contra microrganismos gram-positivos, pois são esses microrganismos que são mais abundantes na microbiota intestinal cultivável de pinguins antárticos (KLEMBERG, 2017). Os antimicrobianos escolhidos foram eritromicina, vancomicina, tetraciclina e estreptomicina, que representam quatro classes usadas na clínica humana e veterinária: macrolídeos, glicopeptídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos, respectivamente.

1.4.1 Macrolídeos

Os representantes desta classe apresentam amplo espectro de ação e podem ser bacteriostáticos e bactericidas, dependendo do microrganismo e da dose utilizada (CLSI, 2012). São utilizados na clínica para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp.. A eritromicina inibe a síntese proteica bacteriana pois se liga à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, o que impede a ligação do tRNA ao ribossomo e prejudica a síntese da cadeia polipeptídica nascente (MURRAY, 2014).

Algumas bactérias apresentam mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos: redução da concentração do antimicrobiano no interior da célula através de bombas de efluxo, inativação enzimática do antimicrobiano e modificação do alvo, que é a subunidade 50S do ribossomo (MCARTHUR et al., 2013). A resistência a macrolídeos também pode ocorrer através da metilação da subunidade do rRNA 23S, que compõe a subunidade 50S, cujas enzimas são codificadas pela família dos genes *erm*. Existe a ocorrência de resistência cruzada entre as classes de antimicrobianos macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B, que possui a sigla de MLS_b. O gene de resistência responsável por este fenótipo é *ermB*. Além disso, os genes *ermB* e *tet(M)*, que codifica resistência à tetraciclina, podem ser transmitidos pelo mesmo elemento genético móvel, o transposon Tn1545 (LEENER et al., 2004). Bactérias da Família Enterobacteriaceae, gram-negativas, são intrinsecamente resistentes à eritromicina (ANVISA, 2008).

1.4.2 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos são classificados como bactericidas; eles atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana devido à ligação do antimicrobiano à extremidade terminal dos dipeptídeos D-alanil-D-alanina, precursores do peptideoglicano que forma a parede celular bacteriana. A enzima transglicosidase fica impedida de atuar e bloqueia a adição de mais monômeros de mureína e dessa forma inibe a síntese da parede celular (CLSI, 2012). A vancomicina é antimicrobiano de escolha de uso clínico em infecções por bactérias gram-positivas resistentes a antimicrobianos β -lactâmicos ou em pacientes alérgicos a penicilinas. As bactérias gram-positivas que apresentam resistência à vancomicina já são consideradas um problema de saúde pública, e *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina são conhecidos como VRE (CDC, 2019). As bactérias gram-negativas possuem resistência intrínseca à vancomicina, pois sua parede celular é envolta pela membrana externa, o que impede que o antimicrobiano se ligue aos precursores do peptideoglicano (GILMORE *et al.*, 2014).

A resistência bacteriana à vancomicina ocorre devido à mudança no sítio-alvo do antimicrobiano, em que os resíduos D-alanil-D-alanina são alterados para D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, impedindo a ligação da vancomicina a seu alvo. Os genes *van(A)*, *van(B)*, *van(C)* e *van(D)* são genes já descritos na literatura que codificam resistência à vancomicina. Bactérias como *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus* possuem o gene *van(C)*, conferindo-lhe uma resistência intrínseca à vancomicina (GHOLIZADEH; COURVALIN, 2000). A avoparcina é um antimicrobiano análogo à vancomicina e confere resistência cruzada. Apesar de não ser mais usada como promotor de crescimento atualmente, a avoparcina é considerada responsável pelo alto índice de bactérias resistentes à vancomicina (como *Enterococcus* sp.) (KHAN *et al.*, 2005).

1.4.3 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro, muito empregadas na clínica humana e veterinária (TRZCINSKI *et al.*, 2000). Esses fármacos atuam inibindo a síntese proteica bacteriana, pois se ligam na subunidade 30S do ribossomo e impedem a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo, o que leva à inibição da continuação da síntese de proteínas (NGUYEN *et al.*, 2014).

Na avicultura, as tetraciclinas foram empregadas como promotores do crescimento (TRZCINSKI et al., 2000). O uso intenso de tetraciclinas ao longo de mais de 60 anos contribuiu para a seleção de bactérias resistentes. Há cerca de 40 genes responsáveis pela resistência a tetraciclinas, como por exemplo os genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(O)*, *tet(M)*, sendo carregados por transposons e plasmídeos (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana a estes fármacos são: bomba 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 da célula através da proteína de efluxo ancorada na membrana; proteção do ribossomo, em que as proteínas codificadas pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* deslocam a tetraciclina, antes ligada à subunidade 30S do ribossomo, permitindo a síntese proteica novamente; e modificação do antimicrobiano, em que *tet(X)* codifica uma monooxigenase que hidroxila a tetraciclina, modificando a conformação do fármaco e reduzindo sua afinidade com o ribossomo bacteriano (NGUYEN et al., 2014). Foram identificados cerca de 22 genes responsáveis pelo sistema da bomba de efluxo, associados à resistência em bactérias isoladas de ambientes como lagos, rios e solo; os genes que codificam proteção ao ribossomo também já foram detectados em bactérias isoladas de rios, lagoas, solos e até mesmo de água potável (ZHANG; ZHANG, 2011). O gene *tet(M)* já foi identificado na microbiota de pinguins antárticos (RAHMAN et al., 2008).

1.4.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas de amplo espectro. Os fármacos pertencentes a essa classe inibem a síntese proteica bacteriana; eles ligam-se ao rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo. Essa ação leva à perturbação da elongação da cadeia polipeptídica nascente, promovendo uma terminação proteica precoce ou uma leitura errada do código, criando proteínas disfuncionais (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999).

Os aminoglicosídeos são comumente usados no tratamento de infecções por bacilos gram-negativos. No caso de bactérias gram-positivas, são utilizados em sinergismo com antimicrobianos que atuem na parede celular bacteriana, como os glicopeptídeos (FLUIT et al., 2003). Para alguns microrganismos, é necessário

administrar uma alta concentração de estreptomicina ou outro aminoglicosídeo, pois bactérias como *Enterococcus* sp. são resistentes a estreptomicina em concentrações usuais para bactérias gram-positivas (CLSI, 2012).

A resistência bacteriana a aminoglicosídeos pode ocorrer através de pelo menos três mecanismos: redução intracelular da concentração do antimicrobiano por bombas de efluxo; alteração enzimática do antimicrobiano, em que a bactéria sintetiza enzimas que alteram o fármaco, diminuindo a afinidade deste pelo sítio A do ribossomo bacteriano; e modificação do alvo do antimicrobiano, através da metilação do rRNA 16S, causando modificação estrutural no sítio A da subunidade 30S, que vem a dificultar a ligação da droga ao ribossomo (SHAKIL et al., 2008).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar a resistência aos antimicrobianos eritromicina, vancomicina, tetraciclina e estreptomicina na microbiota de frangos de corte e compará-la à resistência encontrada na microbiota de pinguins antárticos e pinguins-de-magalhães.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar o fenótipo de resistência aos antimicrobianos supracitados em amostras de fezes de frangos de corte.

2.2.2 Realizar o protocolo de Concentração Inibitória Mínima para as bactérias resistentes isoladas das amostras de fezes de frangos de corte.

2.2.3 Verificar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos supracitados nas bactérias resistentes isoladas de amostras de fezes de frangos de corte.

2.2.4 Identificar gênero e espécie das bactérias resistentes isoladas de amostras de fezes de frangos de corte.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram coletadas amostras de fezes de 39 frangos de corte em aviários nas cidades de Poço das Antas, Cruzeiro do Sul, Teotônia e Venâncio Aires, Rio Grande do Sul, em meados de 2016 pela equipe do Dr. Benito G. de Brito (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro - RS). As amostras foram transportadas sob refrigeração (banho de gelo) e armazenadas a -80 °C.

3.2 Crescimento e isolamento dos microrganismos resistentes

Para isolar os microrganismos resistentes presentes nas amostras de fezes, foram adicionadas 30 a 60 mg de fezes em 1,0 mL de solução salina (PBS 1x); 10 µL dessa suspensão foram inoculados em placas de LB-ágar na presença dos quatro antimicrobianos (eritromicina, ou vancomicina, ou tetraciclina, ou estreptomicina), em concentrações pré-estabelecidas para *Enterococcus* sp. de acordo com o CLSI (CLSI, 2016).

3.3 Protocolo de Concentração Inibitória Mínima

As amostras que cresceram na presença dos antimicrobianos (triagem) foram submetidas ao teste de microdiluição em ágar para verificar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano testado (eritromicina, vancomicina, tetraciclina e estreptomicina). Esse teste foi realizado com base no protocolo normativo do CLSI (CLSI, 2016).

As soluções dos antimicrobianos foram feitas utilizando água Milli-Q ou álcool 95% (no caso da eritromicina) e posteriormente filtradas em membrana com poros de 0,22 µm. As concentrações usadas para as soluções-mãe de cada antimicrobiano foram selecionadas de acordo com as indicações do fabricante, com posterior diluição (se necessário) para obter concentração igual a 10 mg/mL, com o fim de realizar o protocolo de Concentração Inibitória Mínima. Foi realizada diluição seriada dos antimicrobianos em ágar Mueller-Hinton (MH), com pH entre 7,2 e 7,4, na temperatura de 56 °C.

Foi realizada suspensão em PBS dos isolados que cresceram em LB-ágar na presença dos antimicrobianos, ajustando a turbidez de acordo com o padrão 0,5 da escala MacFarland. Após o ajuste, a suspensão foi diluída 1:10, para obter aproximadamente $1-2 \times 10^7$ UFC/mL. Para que houvesse 1×10^4 UFC/mL na placa com ágar Mueller-Hinton, contendo as concentrações pré-determinadas de antibiótico, foram inoculados 2 μ L da suspensão bacteriana. A CIM foi determinada como sendo a concentração de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. Após a determinação da CIM, as bactérias resistentes foram isoladas, tiveram seu DNA extraído e foram armazenadas, individualmente em criotubos, em glicerol 20% a -80 °C.

3.4 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada para determinar o tipo de parede dos isolados que foram submetidos ao protocolo de CIM. Foram utilizados os corantes para coloração de Gram (NEW PROV®), conforme protocolo do fabricante. A identificação e classificação foram feitas com o auxílio de microscópio óptico.

3.5 Extração de DNA

Foi feita a extração de DNA dos isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos usando o protocolo de lise alcalina, em que se suspende de duas a três colônias em 25 μ L de NaOH 0,5 M; após 10 minutos à temperatura ambiente, adiciona-se 25 μ L de tampão TRIS 1 M pH 8,0 e então 450 μ L de água Milli-Q. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Para a extração do DNA das fezes dos frangos de corte, foi utilizado o kit de extração de DNA QIAamp FAST DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

3.6 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos

Para identificar os genes associados à presença de resistência aos antimicrobianos nas amostras de fezes de frangos de corte, foi realizada PCR com os oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 1. Cada reação foi feita em um volume final de 25 μ L: 0,2 μ L (1U) de Taq polimerase 5U/ μ L, concentração final de dNTP = 0,2 mM, 1 μ L (2 mM) de MgCl₂ 50 mM, o par de oligonucleotídeos a

concentração igual a 0,4 mM, 2,5 µL de tampão 10x e 2 µL amostra de DNA, completando o restante do volume com água para injetáveis. A PCR foi executada em termociclador de marca GenePro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology).

Tabela 1. Genes de resistência a antimicrobianos, oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do fragmento, temperatura de anelamento e referências.

Gene	Oligonucleotídeos ¹	Tamanho (pb) ²	Ta ³ (°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>tet (M)</i>	F: 3' GTGGACAAAGGTACAACGAG 5' R: 3' CGGTAAAGTTCGTCACACAC 5'	406	55	(NG et al., 2001)
<i>van (B)</i>	F: 3' AGACATTCCGGTCGAGGAAC 5' R: 3' GCTGTCAATTAGTGCGGGAA 5'	220	56	(IWERIEBOR; OBI; OKOH, 2015)

¹F: forward R: reverse

²pb: pares de base

³Ta: Temperatura de anelamento

3.7 Identificação das espécies bacterianas

As espécies das bactérias resistentes isoladas de amostras de fezes de frangos de corte foram identificadas no MALDI-TOF MICROFLEX BIOTYPER 4.0 do ICBS desta Universidade.

“The matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS) é um método de caracterização e identificação de microrganismos rápido, específico e com bom custo-benefício. A MALDI é uma técnica de ionização branda que permite ionização e vaporização de biomoléculas grandes e não voláteis, como proteínas íntegras, por exemplo. A MALDI-TOF MS gera impressões digitais do espectro de massas de proteínas de cada microrganismo, e é ideal para identificação do gênero e espécie bacterianas (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Um espectrômetro de massas possui 3 unidades funcionais: 1) uma fonte de íons para ionização e transferência dos íons moleculares da amostra para fase gasosa; 2) um analisador de massas, que separa os íons de acordo com sua relação massa/carga; e 3) um dispositivo detector que monitorar íons separados. Diversas

formas de ionização vêm sendo desenvolvidas e o método de ionização é determinado de acordo com a natureza da amostra e o objetivo da análise por espectrometria de massas. (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

No processo da MALDI-TOF MS, a amostra é adicionada a uma matriz em uma placa de metal condutor; após a cristalização da matriz com a amostra microbiana, a placa de metal é introduzida no espectrômetro de massa e é atingida por pulsos rápidos de laser. As moléculas ionizadas são aceleradas através de um campo eletrostático e ejetadas através de um tubo de voo de metal submetido a vácuo até chegar ao detector, com íons menores “viajando” mais rápido pelo tubo que íons maiores. Então, os analitos são separados de acordo com seu tempo de voo (*Time of flight*), gerando um espectro de massa composto pela relação massa/carga com várias intensidades. Portanto, um espectro de massa é como uma impressão digital microbiana que é comparada a uma base de dados para identificação de espécie ou gênero (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

3.8 Comparação entre os resultados das amostras de fezes de frangos de corte e os resultados das amostras de fezes de pinguins antárticos e suabes cloacais de pinguins-de-magalhães

O crescimento e isolamento de microrganismos resistentes, a realização do protocolo de Concentração Inibitória Mínima e a verificação da presença de genes de resistência aos antimicrobianos testados, bem como a identificação das espécies bacterianas presentes nas amostras de fezes de *Pygoscelis antarcticus* e de *Pygoscelis papua* e nas amostras de suabe cloacal de *Spheniscus magellanicus*, foram realizados em trabalho anterior (KLEMBERG, 2017).

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento e isolamento de microrganismos resistentes nas amostras de fezes de frangos de corte

Foram testadas todas as 39 amostras de fezes de frango de corte, sendo que destas, 24 cresceram em pelo menos um dos antimicrobianos. Um total de 21 amostras cresceram em eritromicina (8 µg/mL), 2 cresceram em vancomicina (32 µg/mL), 21 cresceram em tetraciclina (16 µg/mL) e 14 cresceram em estreptomicina (500 µg/mL) (Fig. 1). Foi possível observar que, em LB-ágar contendo concentrações de triagem dos antimicrobianos, houve maior número de amostras resistentes à eritromicina e tetraciclina que à vancomicina e estreptomicina.

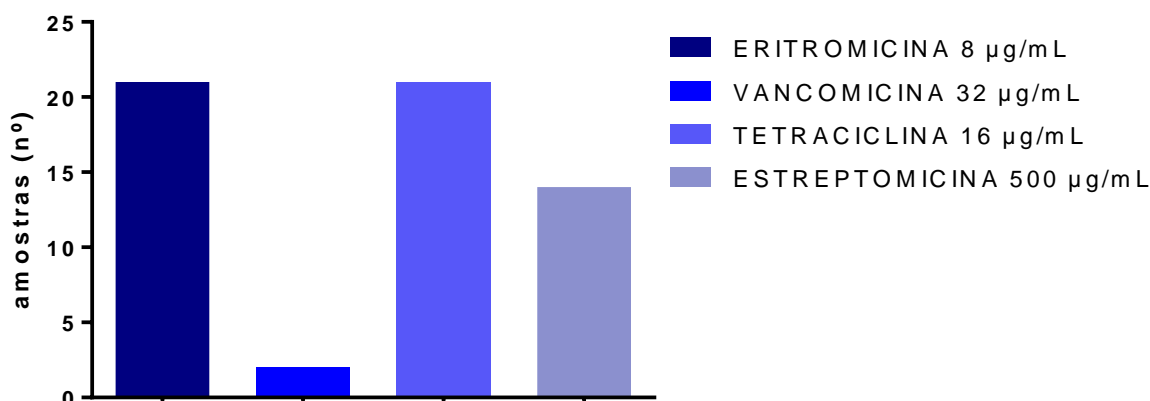


Figura 1. Amostras de fezes de frangos de corte com bactérias resistentes aos antimicrobianos testados.

4.2 Análise do fenótipo de resistência a antimicrobianos dos isolados resistentes em amostras de fezes de frangos de corte

Foi realizado o protocolo de concentração inibitória mínima (CIM) em todas os isolados que cresceram nas concentrações de triagem dos antimicrobianos. Para eritromicina, das 21 amostras que cresceram previamente na triagem com o antimicrobiano, obteve-se 30 isolados resistentes, todos apresentando CIM \geq 500 µg/mL. Para vancomicina, das 2 amostras que cresceram em concentração de triagem deste antimicrobiano, obteve-se 2 isolados resistentes, ambos apresentando CIM $>$ 250 µg/mL. Para tetraciclina, das 21 amostras que cresceram previamente na triagem

com o antimicrobiano, 28 isolados apresentaram CIM > 31 µg/mL, 2 isolados apresentaram CIM > 62 µg/mL e 1 isolado teve CIM > 125 µg/mL. Para estreptomicina, das 14 amostras que cresceram previamente na triagem com esse antimicrobiano, todos os 14 isolados apresentaram CIM ≥ 500 µg/mL (Fig. 2). Observa-se maior número de isolados resistentes à eritromicina e tetraciclina que à vancomicina e estreptomicina.

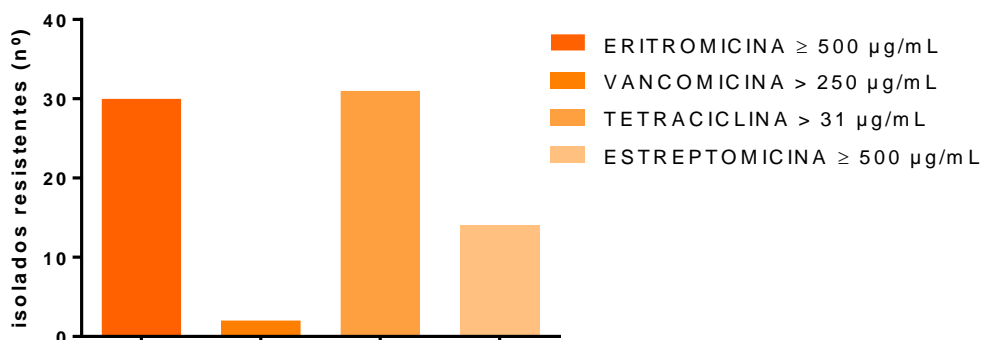


Figura 2. Isolados resistentes presentes nas amostras de fezes de frangos de corte submetidos ao Protocolo de Concentração Inibitória Mínima.

4.3 Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos

Foi extraído DNA dos isolados resistentes à eritromicina, vancomicina e tetraciclina. Nesses isolados, foi realizada PCR para os genes *erm(B)*, que codifica resistência à eritromicina, *van(B)*, que codifica resistência à vancomicina, e para *tet(M)*, que codifica resistência à tetraciclina (Tabela 1). De 30 isolados resistentes à eritromicina, 11 apresentaram o gene *erm(B)*; de 2 isolados resistentes à vancomicina, ambos apresentaram o gene *van(B)*, e de 31 isolados resistentes à tetraciclina, 17 apresentaram o gene *tet(M)* (Tabela 2). Os genes de resistência escolhidos para realizar a identificação são alguns dos mais citados na literatura e também os mais abundantes. Não foi realizada identificação de gene de resistência à estreptomicina, devido à grande quantidade de genes que podem codificar resistência a este antimicrobiano.

4.4 Identificação das espécies bacterianas

Dentre os isolados resistentes de amostras de fezes de frangos de corte, a predominância foi dos gêneros *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. (Tabela 2). Diferentemente das amostras de fezes de pinguins antárticos, que praticamente não apresentaram bactérias gram-negativas, as fezes de frangos de corte são ricas em bactérias gram-negativas, e observamos 4 isolados de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina.

Tabela 2. Espécies bacterianas dos isolados resistentes e genes de resistência presentes.

Isolados resistentes	CIM (µg/mL)	gene <i>erm(B)</i>	gene <i>van(B)</i>	gene <i>tet(M)</i>
ERITROMICINA				
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg5)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg8)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus hirae</i> (Gg9)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg11)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg12)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg14)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg16)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg17)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus xylosus</i> (Gg20)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus xylosus</i> (Gg22)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg25)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg27)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg30.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg30.2)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Rothia nasimurium</i> (Gg31)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Rothia nasimurium</i> (Gg32.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg32.2)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus xylosus</i> (Gg 32.3)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Rothia nasimurium</i> (Gg34)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Gg35.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg35.2)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus xylosus</i> (Gg35.3)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg36.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus sciuri</i> (Gg36.2)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus xylosus</i> (Gg37.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg37.2)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i> (Gg38.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg38.2)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Gg39.1)	≥ 500	-	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg39.2)	≥ 500	+	n.d.	n.d.
VANCOMICINA				
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg33)	> 250	n.d.	+	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg34)	> 250	n.d.	+	n.d.
TETRACICLINA				
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg5)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg8)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg9)	> 31	n.d.	n.d.	+
not reliable identification - N.I. (Gg11)	> 62	n.d.	n.d.	+
no peaks found N.I. (Gg12)	> 31	n.d.	n.d.	+

<i>Escherichia coli</i> (Gg13)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg14)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Enterococcus hirae</i> (Gg15)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg 22)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus cohnii</i> (Gg25.1)	> 31	n.d.	n.d.	-
no peaks found N.I. (Gg25.2)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg27)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Escherichia coli</i> (Gg30.1)	> 125	n.d.	n.d.	-
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg30.2)	> 31	n.d.	n.d.	-
no peaks found N.I. (Gg31.1)	> 31	n.d.	n.d.	+
no peaks found N.I. (Gg31.2)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg32)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Escherichia coli</i> (Gg33.1)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg33.2)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg34.1)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus nepalensis</i> (Gg34.2)	> 31	n.d.	n.d.	-
no peaks found N.I. (Gg35.1)	> 31	n.d.	n.d.	-
no peaks found N.I. (Gg35.2)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus sciuri</i> (Gg36.1)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg36.2)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Escherichia coli</i> (Gg37.1)	> 62	n.d.	n.d.	-
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg37.2)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Gg38.1)	> 31	n.d.	n.d.	-
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg38.2)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg38.3)	> 31	n.d.	n.d.	+
<i>Staphylococcus lentus</i> (Gg39)	> 31	n.d.	n.d.	-
ESTREPTOMICINA				
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg5)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg8)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg11)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus hirae</i> (Gg12)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (Gg13)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg17)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg20)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gg22)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg30)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg32)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg34)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg35)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus gallinarum</i> (Gg36)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i> (Gg38)	≥ 500	n.d.	n.d.	n.d.
N.I.: Não Identificada		+: positivo para o respectivo gene		
n.d.: não determinado		-: negativo para o respectivo gene		
CIM: Concentração Inibitória Mínima				

4.5 Comparação do número de amostras com isolados resistentes em pinguins e frangos de corte

Dentre as amostras de fezes de pinguins antárticos recuperadas ($n = 38$), considerando que foi encontrada resistência a antimicrobianos apenas em fezes de *P. antarcticus* – pois nenhuma amostra de fezes de *P. papua* apresentou isolados

resistentes – 9 amostras apresentaram bactérias resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Das amostras de suabe cloacal de *S. magellanicus* (pinguins-de-magalhães) ($n = 19$), 13 apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados (KLEMBERG, 2017).

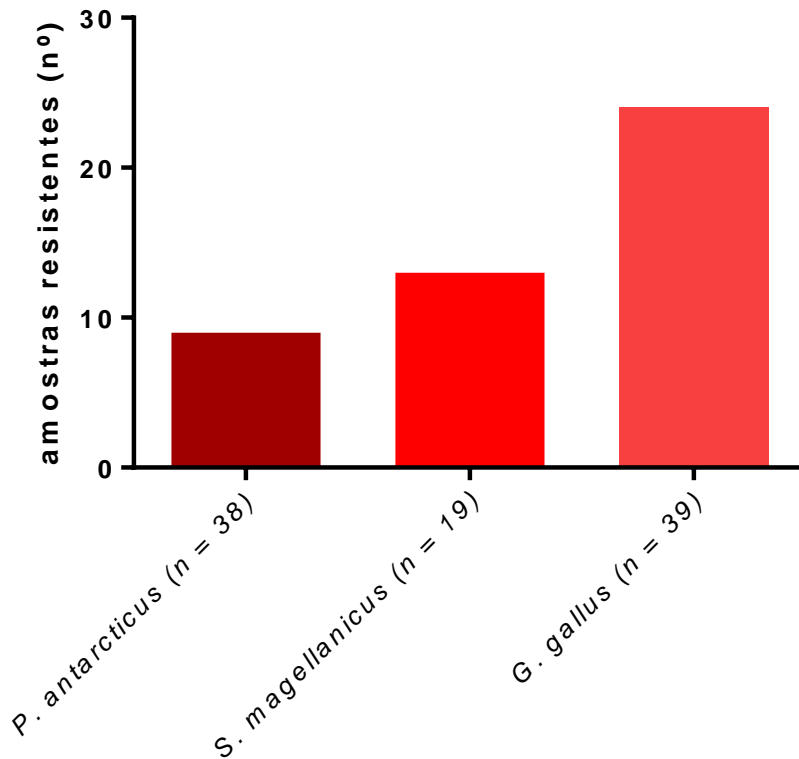


Figura 3. Amostras com isolados resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados dentre as amostras de fezes de *P. antarcticus* e *G. gallus* e amostras de suabes cloacais de *S. magellanicus* (extraído de KLEMBERG, 2017).

Quando analisamos os dados por percentagem, podemos observar que as amostras de suabe cloacal de *S. magellanicus* apresentaram um número proporcionalmente maior de amostras com isolados resistentes do que as amostras de fezes de *P. antarcticus* e *G. gallus*. Mesmo que frangos de corte sofram ação antrópica direta e indireta e tenham a administração de antimicrobianos em sua alimentação, como promotores de crescimento ou para o tratamento de infecções, ainda assim a resistência encontrada nas amostras de *S. magellanicus* foi proporcionalmente maior (Fig. 4). Por tratar-se de uma espécie migratória, os pinguins-de-magalhães abandonam, após o período de reprodução, os sítios reprodutivos e migram através de correntes oceânicas em busca de boa oferta de

alimento (WILLIANS; BOERSMA; STOKES; WILSON, 1995). Por isso, seguem as águas mais frias e com mais nutrientes da corrente das Malvinas, e então atingem as águas da plataforma continental do Brasil (VOOREN; BRUSQUE, 1999). Durante a migração, diversos fatores são responsáveis pela morbimortalidade desses animais, como a contaminação dos oceanos com petróleo e derivados, acidentes com redes de pesca, ingestão de rejeitos e infecções parasitárias (MÄDER; SANDER; CASA JR., 2010). Em comparação aos pinguins antárticos, os pinguins-de-magalhães estão mais sujeitos à ação antrópica, o que favorece a presença de resistência a antimicrobianos em sua microbiota intestinal devido ao contato com resíduos destes medicamentos no ambiente (solo, oceanos etc.).

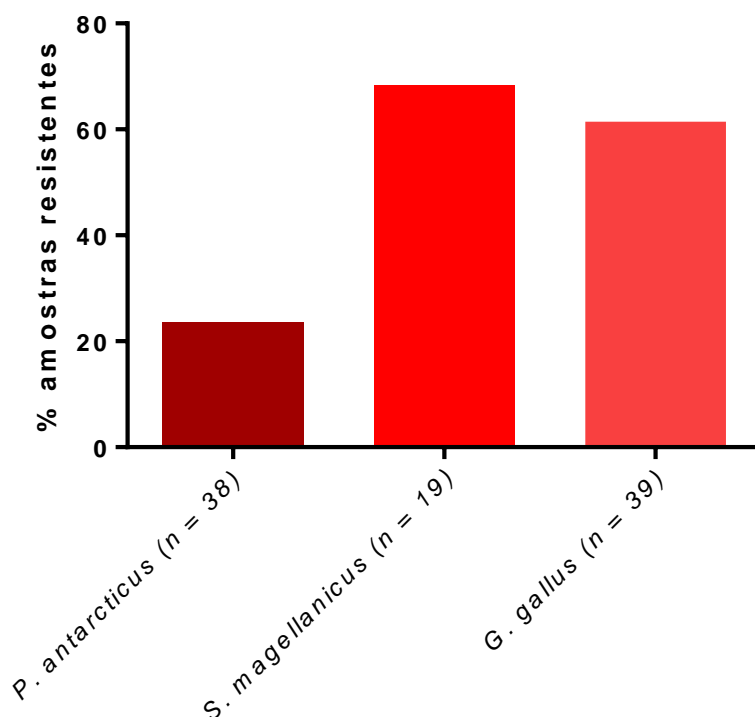


Figura 4. Percentagem de amostras com isolados resistentes na microbiota intestinal de pinguins antárticos, pinguins-de-magalhães e frangos de corte.

Dentre as 38 amostras de fezes de *P. antarcticus*, 4 apresentaram resistência à eritromicina, 5 à tetraciclina, e 1 à estreptomicina. Nenhuma amostra apresentou resistência à vancomicina. Dentre as 19 amostras de suabe cloacal de *S. magellanicus*, 3 amostras apresentaram resistência à eritromicina, uma apresentou

resistência à vancomicina, 9 amostras tiveram isolados resistentes à tetraciclina e 2 apresentaram isolados resistentes à estreptomicina (KLEMBERG, 2017) (Fig. 5).

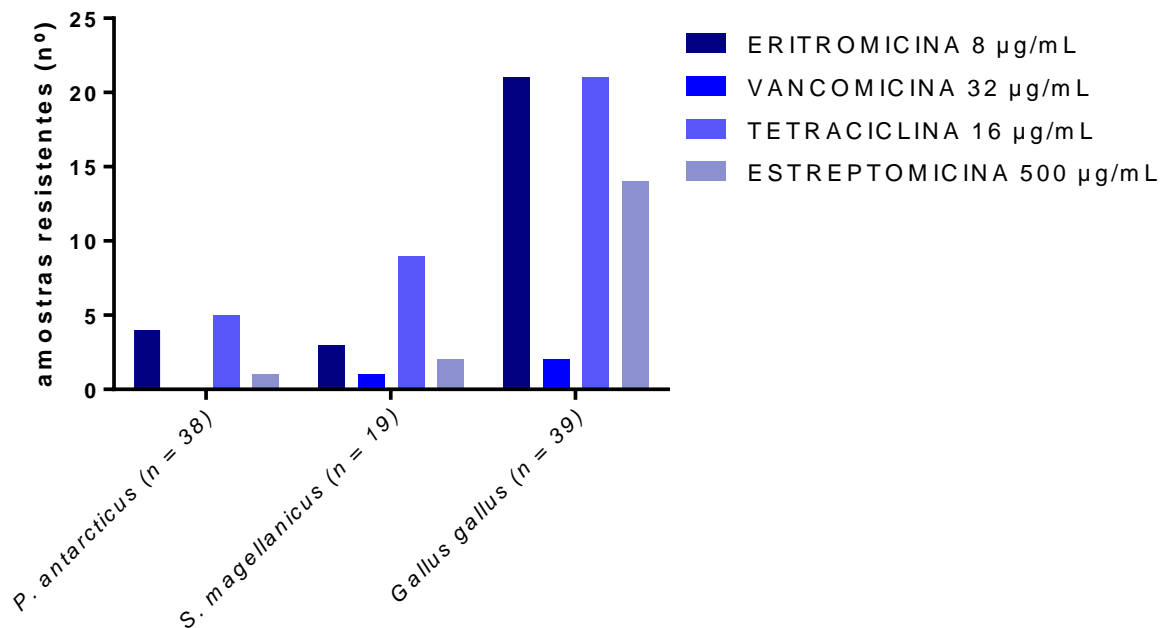


Figura 5. Amostras de fezes de *P. antarcticus*, *S. magellanicus* (suabe cloacal) (extraído de KLEMBERG, 2017) e *G. gallus* com isolados resistentes aos antimicrobianos testados.

Em comparação com as amostras de fezes de frangos de corte, o número de isolados resistentes provenientes das amostras de fezes de *P. antarcticus* e suabes cloacais *S. magellanicus* é menor e, em geral, todos os isolados apresentaram CIMs menores dos respectivos antimicrobianos usados em relação às encontradas para os isolados resistentes provenientes das amostras de fezes de frangos de corte (Fig. 6).

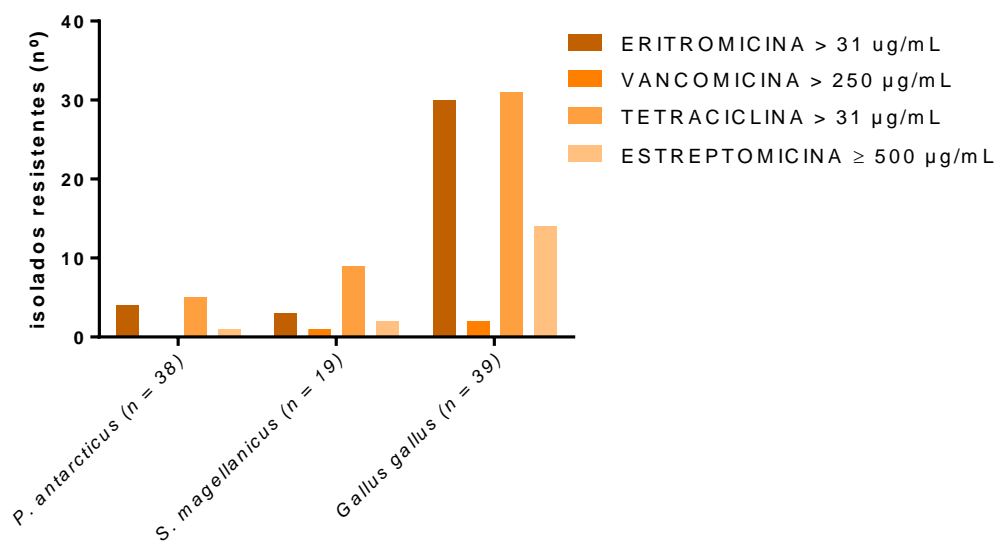


Figura 6. Isolados resistentes presentes nas fezes de *P. antarcticus*, *S. magellanicus* (suabe cloacal) (extraído de KLEMBERG, 2017) e *G. gallus* submetidos ao Protocolo de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisamos a presença e isolamos bactérias resistentes a 4 antimicrobianos, representativos de 4 classes, em 39 amostras de fezes de frangos de corte.

Alguns isolados bacterianos não foram identificados, devido à não correspondência (ou *match*) com nenhum microrganismo já identificado presente no banco de dados do equipamento, o que pode sugerir nova espécie encontrada. Em alguns casos, o isolamento não foi satisfatório para gerar uma identificação fidedigna.

Nas amostras de fezes de pinguins antárticos ocorreu predominância dos gêneros *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp., e não foi possível recuperar bactérias gram-negativas. Nas amostras de suabe cloacal de pinguins-de-magalhães, as espécies bacterianas predominantes pertenciam ao gênero *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp. e *Escherichia* sp. (KLEMBERG, 2017). Diversos fatores podem influenciar na microbiota; neste caso, a alimentação é um fator importante, pois enquanto pinguins alimentam-se de peixes e krill, frangos de corte são criados em confinamento e têm sua alimentação baseada em rações (à base de milho, soja e trigo). Outro fator significativo é o habitat, que pode influenciar tanto devido ao menor contato antrópico que os pinguins antárticos apresentam quando comparados aos pinguins-de-magalhães e frangos de corte - o que pode corroborar com a menor resistência encontrada nas amostras de fezes dos pinguins antárticos.

A microbiota intestinal dos pinguins-de-magalhães apresentou um número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos testados maior do que a microbiota dos pinguins antárticos. Isso provavelmente decorre do fato dos pinguins-de-magalhães estarem expostos a águas marinhas mais contaminadas com resíduos antropogênicos e sua microbiota ter sofrido pressão seletiva. Nos pinguins antárticos, por sua vez, foi identificada uma quantidade de isolados resistentes consideravelmente menor (KLEMBERG, 2017), o que sugere que sua microbiota está menos exposta à pressão seletiva, ou seja, os mares antárticos estariam menos poluídos com resíduos antropogênicos. Esses dados estão de acordo com a proposta de se usar a resistência encontrada nas amostras de fezes de pinguins antárticos como uma linha de base, uma referência, para a resistência encontrada na microbiota de outras aves.

Quando, na comparação, incluímos nossos dados de frangos de corte, observamos que o número de amostras de fezes com isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos testados foi maior que o de amostras de fezes de pinguins antárticos. Esses resultados não surpreendem, visto que os frangos não apenas estão inseridos em um ambiente antrópico como são tratados com antimicrobianos ao longo da sua criação.

No entanto, o número de amostras de fezes de frangos de corte com isolados resistentes foi praticamente igual, na verdade ligeiramente menor, ao número de amostras de suabe cloacal de pinguins-de-magalhães com isolados resistentes. Mesmo que as amostras de fezes dos frangos tenham apresentado, por amostra, um número de isolados resistentes e uma CIM desses isolados maiores do que nas amostras de suabes de pinguins-de-magalhães, nossos dados revelam que os frangos não apresentaram uma excessiva resistência bacteriana nas amostras analisadas. Em nosso entendimento, isso indica a boa qualidade do manejo nas criações brasileiras de frangos de corte.

6 CONCLUSÕES

O número de amostras de fezes de pinguins antárticos com isolados resistentes aos antimicrobianos testados é menor quando comparado aos pinguins-de-magalhães e frangos de corte. O número de amostras de fezes de frangos de corte com isolados resistentes aos antimicrobianos testados foi menor que o de amostras de suabe cloacal de pinguins-de-magalhães com isolados resistentes.

Os resultados encontrados estão de acordo com a hipótese proposta de que a resistência encontrada nas amostras de fezes de pinguins antárticos pode representar uma linha de base para a resistência encontrada na microbiota de outras aves pois, se foi encontrada resistência a antimicrobianos na microbiota de pinguins, que são animais selvagens e com pouco contato antrópico, certamente encontraremos resistência a antimicrobianos na microbiota de outras aves, nesse caso, nas fezes de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>. Acesso em: 3 dez. 2019.

ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251–259, 2010.

ALLIX, E. **PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA FRANGOS DE CORTE**. Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/48980>>. Acesso em: 25 out. 2019

ALVES, D. S. J. M.; MARTINELLI, O.; DEWES, H. DINÂMICA INOVATIVA NO AGRONEGÓCIO : A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NA AVICULTURA INDUSTRIAL POR MEIO DA ANÁLISE DE PATENTES. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 23, p. 207–233, 2006.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **Judicious therapeutic use of antimicrobials**. Disponível em: <<https://www.avma.org/policies/judicious-therapeutic-use-antimicrobials>>. Acesso em: 3 dez. 2019.

ANADÓN, A.; LARRAÑAGA, M. R. M. Eficacia y seguridad de los antimicrobianos utilizados en alimentación animal–perspectiva europea. **SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL**, 1999.

ANVISA. Módulo 2: Gram-negativos fermentadores. **Resistência**, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/control/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/resistencia.htm>. Acesso em: 2 dez. 2019

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of the Total Environment, The**, v. 400, n. 1–3, p. 212–226, 2008.

BHULLAR, K. et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **IUCN Red List for birds**. Disponível em: <<https://www.birdlife.org/>>. Acesso em: 2 dez. 2019.

BORSOI, A. Antibioticoterapia em Avicultura. **Avicultura Industrial**, v. 8, n. Saúde Animal, p. 37–44, 2013.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and the Clinical Laboratory**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/vreclinical-laboratory.html>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - CLSI document M07-A9**, 2012.

CLSI, C. AND L. S. I. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S** Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.

CROMWELL, G. L. Safety issues, performance benefits of antibiotics for swine examined. **Feedstuffs**, v. 7, p. 18–21, 1999.

CROXALL, J.P., TRATHAN, P.N., MURPHY, E. J. Environmental Change and Antarctic Seabird Populations. **Science**, v. 297, p. 1510–1514, 2002.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380–407, 2012.

DEWAR, M. L. et al. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. **Microbiology Open**, v. 2, n. 1, p. 195–204, 2013.

DEWAR, M. L. et al. Influence of Fasting during Moulting on the Faecal Microbiota of Penguins. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

FLUIT, A. C. 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, n. 4, p. 357–359, 2003.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, 1989.

GHOLIZADEH, Y.; COURVALIN, P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. SUPPL. 1, p. 11–17, 2000.

GILMORE, M.S., CLEWELL, D.B., IKE, Y., SHANKAR, N. **Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection** (N. S. Michael S Gilmore, Don B Clewell, Yasuyoshi Ike, Ed.) Boston, Massachusetts, 2014.
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>>

HENDERICKX, H. K., ET AL. **Mode of action of growth promotion drugs. Growth promotion mode-of-action symposium proceedings, Kansas City, Missouri, Smith Kline Animal Health Products.**, 1981.

HOPWOOD, D. A. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 937–940, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. Human health risks with the subtherapeutic use of penicillin or tetracyclines in animal feeds. **National Academy Press**, 1989.

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 Ecological and evolutionary microbiology. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 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, 2005.

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

magellanicus. Porto Alegre, 2017. Disponível em:

<<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/163661>>. Acesso em: 4 nov. 2019

LEENER, E. D. E. et al. Distribution of the erm(B) Gene, Tetracycline Resistance Genes, and Tn1545-like Transposons in Macrolide- and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans. **Microbial drug resistance**, v. 10, n. 4, 2004.

LYNCH, W. **Penguins of the World**. Buffalo, New York, United States: Firefly Books Limited, 2007.

MACARI, M., FURLAN, R. Probióticos. **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 2005.

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, 2006.

MÄDER, A.; SANDER, M.; CASA JR., G. E. PINGUINS-DE-MAGALHÃES ARRIBADOS NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL: COMPOSIÇÃO DA DIETA E ECOLOGIA ALIMENTAR. **III Congresso Brasileiro de Oceanografia**. Rio Grande, 2010.

MAPA. Insumos Pecuários: Alimentação Animal. **Aditivos autorizados e Aditivos proibidos na alimentação animal**, 2018. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>>. Acesso em: 5 dez. 2019

MARTIN, J. F.; LIRAS, P. ORGANIZATION AND EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS AND OTHER SECONDARY METABOLITES. p. 173–206, 1989.

MCARTHUR, A. G. et al. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3348–3357, 2013.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34 Suppl 3, p. S93–S106, jun. 2002.

MICOL, T.; JOUVENTIN, P. Long-term population trends in seven Antarctic seabirds at Pointe Geologie (Terre Adelie). **Polar Biology**, v. 24, p. 175–185, 1 mar. 2001.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727–737, 1999.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. O Brasil e o Meio Ambiente Antártico. **O Brasil e o Meio Ambiente Antártico**, 2007. Disponível em:

<<https://www.mma.gov.br/informma/item/3898-estudo-sobre-meio-ambiente-antartico-coloca-brasil-em-posicao-de-destaque>>. Acesso em: 2 dez. 2019

MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving Resistance among Gram-positive Pathogens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 2, p. S48–S57, 2015.

MURRAY, P. R. E COLS. **Microbiologia Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.** 7ª ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2014.

NG, L. K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, 2001.

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

PARKER, D., ARMSTRONG, D. Antibiotic feed additives and livestock production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 46, n. 3, p. 415–421, 1987.

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

SCHERER, J. F. M.; SCHERER, A. L.; PETRY, M. V. Ocorrência de carcaças de aves marinhas no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 505–513, 2011.

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, 2008.

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

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

VASSALO, M., FIALHO, E.T., OLIVEIRA, A. I. G. ET AL. . Probióticos para leitões dos 10 aos 30 kg de peso vivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 1, p. 131–138, 1997.

VOOREN, C. M.; BRUSQUE, L. F. AS AVES DO AMBIENTE COSTEIRO DO BRASIL: BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO. p. 125–182, 1999.

WILLIAMS, T. D.; BOERSMA, P. D.; STOKES, D. L. E WILSON, P. R. **The penguins**. London: Oxford University Press, 1995.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589–594, 2010.

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 and Technology**, v. 45, n. 7, p. 2598–2604, 2011.