

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
PROJETO DE PESQUISA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS BACTERIANOS E
IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. EM AVES SILVESTRES
EM PALOTINA, PARANÁ, BRASIL**

MATEUS ROCHA RIBAS

**Palotina – PR
2020**

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

Resistência antimicrobiana em isolados bacterianos e identificação de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres em Palotina, Paraná, Brasil.

Equipe

Silvia Cristina Osaki (Orientador)

Sheila Rezler Wosiacki (Coorientadora)

Mateus Rocha Ribas (Mestrando)

Colaboradores

Marcia Santos de Menezes

1. QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

As zoonoses são infecções naturalmente transmissíveis de animais vertebrados para o homem e vice-versa. Estas infecções podem ser virais, fúngicas, bacterianas ou parasitárias (WHO, 2020). Nos animais, as zoonoses podem apresentar sinais clínicos com um forte impacto nas populações e na biodiversidade local, no entanto, a forma subclínica das infecções zoonóticas parece ser mais comum, representando um elevado risco às populações humanas e a outras espécies de animais (BARBOSA et al. 2011).

De acordo com Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (2020), 60% das doenças humanas são zoonóticas e pelo menos 75% das doenças emergentes e reemergentes em humanos são originárias de animais. Portanto, as zoonoses apresentam um grande problema na saúde única.

As zoonoses bacterianas e parasitárias vêm tendo uma grande atenção na saúde única, pois parte delas são consideradas Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA). As infecções alimentares geralmente são causadas por bactérias ou parasitas naturalmente encontradas nos animais, e acabam originando surtos alimentares, os quais são resultantes da associação entre o consumo de alimentos contaminados através da manipulação inafetiva e pela conservação ou distribuição inadequada (OLIVEIRA et al. 2010).

O Brasil possui uma das mais ricas avifaunas do mundo, alcançando expressivas 1924 espécies catalogadas (PIACETTINI et al. 2020). As aves desempenham um papel indispensável na natureza, tendo um imprescindível valor nas regenerações das florestas, nos controles populacionais de insetos e pragas, na polinização das flores e na decomposição da matéria orgânica (RIBEIRO et al, 2013; MARCON, 2016. MANGAN et al. 2017). A perda, degradação e fragmentação do habitat e o comércio ilegal de aves, são as principais ameaças a estes vertebrados no Brasil, onde se estima que entre 10 a 15% dos mesmos se encontram ameaçados de extinção (MARINI & GARCIA, 2005).

Apesar do Brasil contar com uma gigantesca biodiversidade florística e faunística, o avanço da agricultura e pecuária próximo às áreas naturais vêm proporcionando um contato direto entre o homem, os animais domésticos e os animais silvestres. Esta proximidade facilita a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e novos ambientes (SILVA, 2005).

As aves silvestres apresentam uma ampla mobilidade e, por muitas delas serem granívoras, acabam permeando aviários e ambientes onde animais de produção estão alojados, desta maneira, o homem e animais, sejam domésticos ou silvestres, podem se contaminar com inúmeros patógenos, principalmente via fecal-oral (DIAS et al. 2019).

A relação de proximidade entre o homem e as aves decorrente da crescente urbanização traz consequências tanto para a saúde dos animais quanto para a saúde do homem. As zoonoses que permeiam esta relação podem abranger doenças com alta

virulência e até outras com menor importância à saúde, no entanto, todas as infecções merecem atenção, visto que o potencial zoonótico dos micro-organismos apresentam variações patogênicas de acordo com o hospedeiro que o alberga (TORRES et al, 2015).

O uso exacerbado de antibióticos nas criações animais e na saúde humana vêm causando grandes impactos ambientais, uma vez que muitas dessas moléculas não são metabolizadas totalmente no organismo, contaminando o solo, a água superficial e subterrânea. A ocorrência desses produtos no ambiente pode selecionar microrganismos resistentes aos antibióticos, além de causar problemas toxicológicos nos organismos vivos (REGITANO & LEAL, 2010).

Nas duas últimas décadas, a rapidez e a extensão nas quais vários patógenos têm desenvolvido resistência a antibacterianos têm surpreendido. O contato com antibióticos não induz à resistência, mas elimina bactérias suscetíveis, enquanto que bactérias resistentes permanecem e se multiplicam na população, disseminando genes de resistência. A exposição dos animais com antimicrobianos é a chave para seleção, propagação de genes e bactérias resistentes (PRESCOTT, 2017).

As bactérias resistentes parecem ter uma estreita relação com aves silvestres. De acordo com Bonnedahl & Järhult (2014), estes vertebrados: 1) agem como sentinela espelhando as atividades humanas e seu impacto ambiental devido aos diversos nichos ecológicos e a facilidade de se contaminarem com resíduos e bactérias de origem humana. 2) agem como reservatórios e incubadores de bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência destes microrganismos. 3) agem como potenciais dispersores de bactérias resistentes a longas distâncias em um curto período de tempo, devido à sua habilidade de voo e migração. 4) agem como possíveis fontes de contaminação a seres humanos e animais de produção. Portanto, é de fundamental importância conhecer as espécies da avifauna que podem albergar bactérias patogênicas (DIAS et al. 2019).

As aves podem ser portadoras e reservatórios de várias zoonoses, tais como Coronavírus, Influenza aviária, Doença de New Castle, Febre do Oeste do Nilo, Criptococose, Histoplasmose, Toxoplasmose, Ornitose, entre outras (TORRES et al. 2015). No entanto, devido ao aumento da resistência de bactérias a antibióticos, e com poucos trabalhos referentes a zoonoses parasitárias em aves silvestres, a importância de estudos científicos nestas áreas se torna cada vez mais emergente. Para tanto, em nosso trabalho abordaremos a resistência bacteriana na família Enterobacteriaceae e em *Staphylococcus* spp., também buscaremos isolar e identificar *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres no município de Palotina, oeste do Paraná.

Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por bactérias gram-negativas e de “corpo” em forma de bastonetes. A família é representada por 46 gêneros e 263 espécies de bactérias. Algumas destas espécies são importantes causadoras de doenças intestinais e extraintestinais em animais de produção, de companhia, silvestres e nos seres humanos. As infecções extraintestinais se instalam com frequência no sistema urinário e respiratório, na corrente sanguínea e em ferimentos. Destacam-se os gêneros *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e *Yersinia*, por serem potenciais bactérias patogênicas em animais e ao homem, muito embora algumas destas espécies possam ser encontradas naturalmente na flora intestinal de várias espécies de animais e no homem, como é o caso da *Escherichia coli* (SANTOS & VARAVALLO, 2011; MORAES et al. 2014, MOXLEY, 2017).

As bactérias da família Enterobacteriaceae são inativadas por luz solar, dessecação, pasteurização e desinfetantes comuns, podendo sobreviver por meses em ambientes úmidos e sombreados, como pastagens, caixas de excreta e material de cama de aviário (MOXLEY, 2017). Quanto aos antibióticos, a maioria é suscetível aos antimicrobianos de amplo espectro, no entanto recentemente muitas bactérias desta família vem produzindo enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). A produção de ESBL torna bactérias resistentes a uma série de antibióticos, tais como Cefalosporinas, Penicilinas e Monobactâmicos (OLIVEIRA et al. 2009). Cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. são as principais produtoras das ESBLs, e devido a esta resistência, terapias para combater infecções vêm se tornando ineficientes, necessitando a busca por novos fármacos com a capacidade de inibir as ESBLs (ANDRADE et al. 2018).

Os plasmídeos bacterianos são as principais rotas de dispersões de genes de resistência das bactérias. As ESBLs são encontradas nestas moléculas e podem ser amplamente transferidas de uma cepa bacteriana a outra e entre diferentes espécies de bactérias (TODAR, 2011).

O primeiro registro de bactéria resistente a antibióticos em animais silvestres foi registrado em 1975 em pombos e corvos. A bactéria em questão se tratava de *E. coli* resistente a Cloranfenicol (SATO et al, 1978). As aves silvestres apresentam grande importância na dispersão de *E. coli* resistentes a antibióticos, já tendo sido isoladas de patos, gansos, aves de rapinas, gaivotas, pombos e pássaros. Recentemente vários estudos vem isolando *E. coli* produtoras de ESBL em aves silvestres, especialmente na Europa (BONNEDAHN & JÄRHULT, 2014). No Brasil, poucos trabalhos são realizados em aves silvestres, sendo a maioria realizados com psitacídeos (HIDASI, 2010; HIDASI et al. 2013). Portanto a pesquisa, isolamento e identificação de possíveis reservatórios de enterobactérias resistentes a antimicrobianos são extremamente importantes para a saúde

pública, afim de monitorar e realizar medidas preventivas para diminuir a incidência da doença em humanos e nos animais.

Staphylococcus spp.

Os estafilococos são bactérias gram-positivas presentes na pele e nas suas superfícies epiteliais (fossas nasais e membranas de mucosas) de todos os animais de sangue quente. Algumas espécies de estafilococos produzem a enzima coagulase (capaz de ativar a protrombina, levando a coagulação do plasma), estas bactérias são conhecidas como *Staphylococcus* Coagulase-positivas. Em geral, estas estirpes são mais virulentas, não obstante ressalta-se que estirpes coagulase-negativas também podem ser patogênicas, destacando-se a mastite bovina, uma importante infecção de importância na medicina veterinária (GHARIB et al. 2013; SMELTZER & BEENKEN, 2017).

A espécie *Staphylococcus aureus* é considerada um patógeno oportunista em humanos e em animais. Esta bactéria apresenta uma alta virulência e patogenicidade, atingindo principalmente organismos com baixa imunidade, portanto, apresenta grande importância para a Saúde Pública por ser frequentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente nosocômio (OMS, 2018; LIMA et al. 2019)

Há algumas décadas, infecções por estafilococos eram amplamente tratadas com penicilina, no entanto, este tratamento foi se tornando cada vez mais ineficaz, em razão da extensa produção de betalactamases (ESBL) por todas as espécies de estafilococos. Como alternativa desde viés, o uso de penicilinas semissintéticas (metilina) se tornou cada vez mais frequente, levando novamente a formação de cepas resistentes, denominadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina (MRSA).

Nos últimos anos, uma nova cepa foi identificada na Europa, EUA e Ásia, utilizando como hospedeiros principalmente animais de produção (bovinos, suínos e aves), esta nova cepa ficou conhecida como Livestock-associated (LA-MRSA) (ARMAND-LEFEVRE et al. 2005; CUNY et al. 2013; STROMMENDER et al. 2018). Estudos recentes evidenciaram a transmissão deste patógeno a humanos para animais de produção e vice-versa, muito embora infecções graves em animais sejam raras, sendo o homem considerado o principal reservatório da doença (WITTE et al. 2007; CUNY et al, 2013; UMARU et al. 2013).

A contaminação por LA-MRSA pode causar os mesmos sintomas em humanos que a MRSA, podendo ser introduzida em ambientes nosocômios, causando infecções hospitalares, levando a pneumonia, septicemia, bacteremia, entre outras infecções resistentes a antibióticos. (CUNY et al. 2015).

Estudos que visam identificar *Staphylococcus* em animais silvestres têm sido raros, no entanto por se tratar de uma doença letal à vida dos seres humanos, sua presença em

animais é uma preocupação em nível de saúde única, portanto, estudos que visem identificar este patógeno é extremamente necessário (GREMA et al. 2015; BONSAGLIA et al. 2018).

Infecções Parasitárias e a criptosporidíose

As infecções parasitárias, apesar de menos emergentes que infecções bacterianas e virais, são comuns em todos os continentes e encontradas em inúmeros ecossistemas (HILL & DUBEY, 2010). Certas protozooses, como toxoplasmose, giardíase e criptosporidíose acometem grande parte da população mundial e, não raro, algumas infecções causadas por estas doenças podem ser assintomáticas, permitindo infecções cruzadas entre inúmeros hospedeiros.

Problemas sanitários relacionados com endoparasitas são comuns em aves silvestres, principalmente em grandes populações. Estas infecções podem ser assintomáticas ou levar o animal a óbito. Algumas destas endoparasitoses podem apresentar um potencial zoonótico, ocasionando infecções em humanos através do contato direto ou indireto com estes vertebrados (FREITAS et al. 2002; MARIETTO-GONÇALVES et al. 2008).

As aves são importantes organismos em cadeias de transmissão de parasitoses, pois quando infectadas com patógenos humanos podem contaminar alimentos, fontes de água de consumo ou de uso recreacional, representando um elevado risco a saúde única (KARANIS et al. 2007).

A criptosporidíose é uma zoonose causada pelo agente etiológico *Cryptosporidium* spp., um minúsculo coccídio que parasita o ápice das microvilosidades dos enterócitos, vesícula biliar, epitélio respiratório e renal, sobretudo em hospedeiros imunocomprometidos (BOWMAN et al. 2006).

A criptosporidíose passou a ter importância para a saúde pública a partir da década de 1980 com os crescentes casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e desde então passou a ser considerada uma doença emergente e incluída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas (PEREIRA et al. 2010).

Uma gama de vertebrados é acometida pelo *Cryptosporidium* spp., tendo sido identificado em peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, sendo o homem o principal hospedeiro sintomático da doença (RYAN et al. 2014).

Os principais surtos desta doença são acometidos principalmente pela ingestão da água, uma vez que estes organismos são extremamente resistentes, sendo inativados apenas por temperaturas extremas (0°C a 65°C), dessecação ou desinfestação por amônia 5% ou formalina 10% (impraticavelmente concentrados). A vasta quantidade de

reservatórios permite a infecção cruzada entre diferentes espécies, aumentando a possibilidade de invasão do parasita no ambiente hídrico (BOWMAN, et al. 2006; MEDEMA et al. 2006; PEREIRA et al. 2010; RYAN et al. 2014).

A criptosporidiose é uma das principais causas de diarreias mundialmente, sendo responsável por 0,6 a 7,3% dos casos em países industrializados, podendo ser maior em países com condições sanitárias precárias. Para se ter ideia, o maior surto de criptosporidiose aconteceu em Milwaukee, Wincousin, nos Estados Unidos, afetando mais de 400.000 pessoas, quando o fornecimento de água da cidade foi contaminado pelo esgoto durante fortes chuvas da primavera do país (PAINTER et al. 2016).

As complicações desta zoonose em pacientes imunodeprimidos podem levar a diarreia crônica, perda de peso acentuada, desidratação, distúrbios eletrolíticos e comprometimento pulmonar, podendo levar a morte destes pacientes (ALBUQUERQUE et al. 2012).

Por se tratar de uma doença com uma ampla variedade de hospedeiros, apresentar um alto potencial zoonótico, ser subnotificada, e alta resistência ambiental, podendo contaminar alimentos, a água e o solo, possibilitando surtos em alta escala, acarretando prejuízos econômicos e sociais, é necessário estudar, entender seu ciclo silvestre e buscar a implantação de medidas preventivas visando a diminuição do impacto desta doença (MADRID et al. 2015).

2. OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADAS

Objetivo geral: Determinar o perfil epidemiológico, molecular e de resistência pela detecção de genes associados à resistência antimicrobiana em Enterobacteriaceae e em *Staphylococcus* spp. e identificar a existência de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres em Palotina, Paraná, Brasil.

Objetivo específico 1: Capturar e identificar aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina – PR.

Meta 1: determinar o melhor local para a captura das aves silvestres

Meta 2: realizar um plano amostral significativo

Meta 3: realizar a coleta dos indivíduos, quantificá-los e identificá-los ao nível de espécie

Objetivo específico 2: Isolar e avaliar a distribuição de cepas de enterobactérias produtoras de ESBL em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina

Meta 1: Isolar cepas de Enterobacterias utilizando coleta do material biológico por *swabs* na região cloacal das aves silvestres capturadas

Meta 2: Pesquisar a expressão de colônias ESBL+ e avaliar a presença de possíveis genes de resistências

Objetivo específico 3: Isolar e avaliar a distribuição de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina

Meta 1: Isolar cepas de *Staphylococcus* spp. pela coleta do material biológico por *swabs* na região orofaríngea das aves silvestres capturadas

Meta 2: Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente as amostras

Meta 3: Avaliar a resistência aos antimicrobianos das amostras de *Staphylococcus* spp.

Objetivo específico 4: Analisar a ocorrência molecular de *Cryptosporidium* spp. em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina e seu possível potencial zoonótico

Meta 1: Determinar as espécies de *Cryptosporidium* spp. encontradas em aves silvestres por meio de análises de PCR e sequenciamento.

Meta 2: Avaliar se os isolados possuem potencial zoonótico

3. METODOLOGIA A SER EMPREGADA

Área de estudo

O presente trabalho será realizado no Parque Estadual de São Camilo, localizado no município de Palotina, Paraná (24° 18' 57.13"S; 53° 54' 38.55"W). Esta unidade de conservação apresenta uma área de 385, 34 hectares de floresta estacional semidecidual, fitofisionomia de Mata Atlântica. A área do parque abrange 0,57% da área palotinese e, por ser um dos únicos remanescentes florestais da cidade é provável que lá se encontre a maior diversidade, riqueza e abundância de aves silvestres no município.

Além da biodiversidade do parque, outra característica importante da escolha deste local para este projeto é a sua proximidade com a cidade e com áreas rurais e cultivadas, inferindo uma possível uma comunicação entre animais silvestres,

animais de produção e com a população. Portanto a pesquisa neste local é bastante pertinente para a obtenção dos resultados deste projeto.

Procedimentos metodológicos para captura das Aves Silvestres

As aves silvestres serão capturadas durante os meses de setembro de 2020 a abril de 2021 totalizando oito meses de captura dos animais. No local de pesquisa serão instaladas oito redes de neblina (9 x 3 m), sendo quatro distribuídas em trilhas no interior da mata e quatro distribuídas na borda da mata. As redes serão instaladas no mínimo 200 metros de distância uma da outra.

As redes de neblina consistem no método mais utilizado para captura de aves silvestres. É um método prático, versátil, eficiente e seguro, capaz de capturar uma grande espécie de aves, mesmo as conspícuas, quanto as de difícil observação (LUGARINI et al. 2014).

As redes de neblinas serão abertas pouco antes da alvorada, e permanecerão abertas por seis horas, onde somente serão fechadas antes deste prazo em caso de tempestade, ventania, calor ou frio intenso ou outra situação ambiental que prejudique o bem-estar das aves. Pretende-se realizar as coletas durante quatro ou cinco dias mensais.

As aves capturadas serão retiradas das redes de neblina e acondicionadas em sacos de pano de algodão e serão levadas até a base de campo, onde serão processados os dados e os materiais biológicos. Ao observar qualquer sinal de estresse na ave, tais como: ave ofegante, arrepiada, olhos fechados e respiração com bico aberto, a ave será solta sem que haja o processamento dos dados e coleta do material biológico. Os sacos de transporte serão utilizados do avesso a fim de evitar o enrosque do animal com fios do saco, os mesmos também não serão reutilizados antes de serem lavados com adição de cloreto de amônio.

Na base de campo serão registrados em fichas individuais os seguintes dados das aves: data, local, espécie, maturidade (idade), sexo (quando possível), peso do saco vazio, peso do saco com o animal e dados morfométricos tais como: comprimento da asa e cauda.

Para o isolamento das enterobactérias, serão colhidas amostras cloacais, utilizando *swabs* estéreis com meio de transporte. Após a introdução do *swab* na

cloaca da ave, serão realizados movimentos circulares e rotatórios. O material será imediatamente acondicionado sob refrigeração.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp. o *swab* será introduzido na cavidade oral onde serão realizados movimentos circulares e rotatórios. Após este procedimento, o *swab* também será imediatamente acondicionado sob refrigeração.

Amostras fecais serão coletadas para o isolamento e identificação de *Cryptosporidium* spp. As fezes serão coletadas sempre que o animal capturado defecar, isto poderá ocorrer na rede de neblina, no saco de contenção de algodão e durante o manejo do animal para coleta dos dados. As fezes serão acondicionadas em tubos de poliestileno e armazenadas sob refrigeração até ser transportada para o laboratório.

Procedimentos laboratoriais

As amostras armazenadas refrigeradas serão encaminhadas aos Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, onde serão realizadas análises específicas para o isolamento bacteriano, seguido pelos testes para caracterização de produção de resistências a antimicrobianos.

Para enterobactérias, as alíquotas serão semeadas em placas de petri contendo Ágar MacConkey, e incubadas a 37°C, sendo avaliado o crescimento bacteriano após 24 e 48 horas. As colônias com crescimento característico neste ágar serão avaliadas para produção de ESBL.

Para identificação das enterobactérias será realizada a coloração de gram e a prova bioquímica de oxidase.

A sensibilidade antimicrobiana das enterobactérias será testada pela técnica de disco descrita por Bauer et al. (1966), onde será testada a resistência à Amoxicilina com Clavulanato, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepima e Cefoxitina.

Após o isolamento microbiológico as colônias deverão ficar armazenadas em freezer a temperatura de -20°C. As cepas isoladas serão utilizadas para a extração de DNA, o mesmo será realizado a partir de protocolos a serem definidos. Em seguida, o DNA será avaliado genotipicamente utilizando PCR para verificar a presença de genes de resistência. Os genes a serem pesquisados ainda serão definidos.

Os *swabs* coletados na orofaringe das aves para o teste de *Staphylococcus*, serão inoculados em placas de petri contendo Ágar Sangue e *BairdParker*. As placas serão incubadas a 36°C a 24 e 48 horas. Após o crescimento, as colônias isoladas serão novamente semeadas em placas com o mesmo meio. As colônias identificadas serão separadas e acondicionadas até o momento da caracterização molecular. Para as análises de *Staphylococcus* spp. os genes de resistência pesquisados serão *mecA* e *blaZ*.

Para a identificação de *Staphylococcus* spp. serão realizadas as provas bioquímicas de catalase, coagulase e coloração de gram.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. serão submetidos ao teste de resistência a antimicrobianos utilizando a técnica de *Breakpoint* segundo Bae et al. (2005), que permite a análise simultânea de diferentes isolados, considerando uma concentração fixa do antibiótico, determinada através dos limites de resistência estabelecidos pela CLSI.

Os antibióticos a serem testados serão: Penicilina, Oxacilina, Cefalotina, Clindamicina, Tetraciclina, Gentamicina, Amicacina, Ciprofloxacina, Eritromicina e Sulfazotrim.

As fezes coletadas para análise molecular de *Cryptosporidium* spp. serão encaminhadas ao laboratório e serão mantidas resfriadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

Antes de realizar a extração do DNA do *Cryptosporidium* spp. as fezes serão purificadas com gradiente de sacarose. Este método consiste em centrifugar a amostra para remover os oocistos das fezes. Após a purificação, é necessária congelar e descongelar 20 vezes as amostras contendo os oocistos para romper a parede dos mesmos. Apenas após esta etapa é possível realizar a extração do DNA. O kit e o protocolo para identificação molecular das espécies de *Cryptosporidium* spp. através da PCR ainda serão definidos.

4. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS OU TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

O uso exacerbado de antibióticos na saúde humana e na saúde animal vem trazendo cada vez mais problemas ambientais, grande parte destes ocasionado pelo

fato de nem todas as substâncias presentes nos antibióticos serem totalmente metabolizadas pelo corpo do usuário.

Devido à crescente urbanização, as áreas agrícolas e de produção estão progressivamente mais próximas das áreas naturais, com isto, os produtos metabólicos dos animais de produção e do homem estão muito próximos dos animais silvestres, podendo contaminá-los, e por consequência, serem possíveis reservatórios de cepas patogênicas resistentes de várias bactérias de interesse a saúde única, tais como as enterobactérias e o *Staphylococcus* spp.

A maioria dos trabalhos em Saúde Única estudam a saúde humana e a saúde animal (de produção), no entanto poucos trabalhos buscam analisar a importância dos impactos antrópicos na saúde ambiental.

Este trabalho tem como objetivo contribuir para a Saúde Única evidenciando que cepas resistentes a antibióticos podem estar circulando no ambiente silvestre através das aves, levando o aumento de reservatórios para doenças bacterianas emergentes e reemergentes, as quais podem impactar a Saúde Humana e a Saúde Animal.

Além disto, ao investigar molecularmente a presença de *Cryptosporidium* spp. podemos identificar potenciais espécies zoonóticas que podem levar a infecções humanas e até mesmo surtos em algumas populações, ou seja, poderemos identificar novas rotas de transmissões da zoonose.

Trabalhos com a fauna silvestre são paulatinamente importantes para a saúde pública, uma vez que grande parte das doenças humanas iniciam ou apresentam os animais como reservatórios. Desta maneira, este trabalho buscará ajudar a preencher esta lacuna tão necessária.

5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

| Atividades | MESES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | |
| Objetivo 1. Capturar e identificar aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina – PR. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 1 - determinar o melhor local para a captura das aves silvestres | | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 2 - realizar um plano amostral significativo | | | | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 3 - realizar a coleta dos indivíduos, quantifica-los e identifica-los ao nível de espécie | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Objetivo 2. Isolar e avaliar a distribuição de cepas de enterobactérias produtoras de ESBL em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 1 - Isolar cepas de Enterobacterias através da coleta do material biológico por swabs na região cloacal das aves silvestres capturadas | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Meta 2 - Pesquisar a expressão de colônias ESBL+ e avaliar a presença de possíveis genes de resistências | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Objetivo 3. Isolar e avaliar a distribuição de cepas de Staphylococcus spp. resistentes a antimicrobianos em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 1 - Isolar cepas de Staphylococcus spp. através da coleta do material biológico por swabs na região orofaríngea das aves silvestres capturadas | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Meta 2 - Meta 2: Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente as amostras | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Meta 3 - Meta 3: Avaliar a resistência aos antimicrobianos das amostras de Staphylococcus spp. | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Objetivo 4. Analisar a ocorrência molecular de Cryptosporidium spp. em aves silvestres em uma área florestada do município de Palotina e seu possível potencial zoonótico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Meta 1 - Determinar as espécies de Cryptosporidium spp. encontradas em aves silvestres por meio de análises de PCR e sequencial. | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Meta 2: Avaliar se os isolados possuem potencial zoonótico | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Demais atividades | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cumprimento de créditos | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Apresentação de resultados parciais em anais de evento | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | | | | | | | | |

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBUQUERQUE, Y. M. M.; SILVA, M. C. F.; ANDRADE LIMA, A. L. M.; MAGALHÃES, V. Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS patients, an underdiagnosed disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 38(4), 530-532, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132012000400017>

ANDRADE, L. N.; NOVAIS, Â.; STEGANI, L. M. M.; FERREIRA, J. C.; RODRIGUES, C.; DARINI, A. L. C.; PEIXE, L. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M (-2,-8,-15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 91(2), 164-168, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007>

ARMAND-LEFEVRE, L.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. **Emerging infectious diseases**, 11(5), 711, 2005. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1105.040866>

BAE, W.; KAYA, K. N.; HANCOCK, D. D.; CALL, D. R.; PARK, Y. H.; BESSEL, T. E. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. **Applied and Environmental Microbiology** 71(1), 169-174, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.71.1.169-174.2005>

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, 14, 1-9, 2011.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45(4), 493-496, 1966.

BONNEDAHL, J.; JÄRHULT, J. D. Antibiotic resistance in wild birds. **Upsala journal of medical sciences**, 119(2), 113-116, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>

BONSAGLIA, E. C. R.; SILVA N. C. C., ROSSI, B. F., CAMARGO, C. H., DANTAS, S. T. A., LANGONI, H., ...; RALL, V. L. M. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Microbial pathogenesis**, 124, 130-135, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.031>

BOWMANN, D.D.; LYNN, R.C.; EBERHARD, M.L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Barueri: Manole, 2006.

CUNY, C.; KÖCK, R.; WITTE, W. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. **International Journal of Medical Microbiology**, 303(6-7), 331-337, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.010>

CUNY, C.; ABDELBARY, M.; LAYER, F.; WERNER, G.; WITTE, W. Prevalence of the immune evasion gene cluster in *Staphylococcus aureus* CC398. **Veterinary microbiology**, 177(1-2), 219-223, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.031>

DIAS, P.A.; MORAES, T.P.; WILSMANN, D.E.; FERRASCO, M.M.; MARINHEIRO, M.F.; HEINEN, J.G.; ...; TIMM, C.D. Ocorrência de *Campylobacter* e Enterobacteriaceae em aves silvestres e frangos de cortes. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 71(1), 225,231, 2019.

FREITAS, M.F.L.; OLIVEIRA, J.B.; CAVALCANTI, M.D.B.; LEITE, A.S.; MAGALHÃES, V.S.; OLIVEIRA, R.A. Parasitos gastrointestinais de aves silvestres en cautiverio en el estado de Pernambuco, Brasil. **Parasitología latinoamericana** 57.1-2: 50-54, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122002000100012>

GHARIB, A. A.; ADEL ATTIA, M. A.; BENDARY, M. M. Detection of the coa gene in Staphylococcus aureus from different sources by polymerase chain reaction. **International Journal of Microbiological Research**, 4(1), 37-42, 2013. DOI: <https://doi.org/10.21608/SCVMJ.2013.78290>

GREMA, H. A.; GEIDAM, Y. A.; GADZAMA, G. B.; AMEH, J. A.; SULEIMAN, A. Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a review. **Advances Animal Veterinary Sciences**, 3(2), 79-98, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2.79.98>

HIDASI, H. W. **Detection of Enterobacteriaceae and Chlamydophila spp. in parrots from the distribution center of the Goiás Wildlife**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

HIDASI, H. W.; NETO, J. H.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and Escherichia coli antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 44(1), 1-7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.1>

HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Food-Bourne Parasites *In*: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N. **Pathogens and Toxins in Foods**. Washington: ASM Press, 2010. p. 195-217

KARANIS, P.; PLUTZER, J.; HALIM, N. A.; IGORI, K.; NAGASAWA, H.; ONGERTH, J.; LIQING, M. Molecular characterization of Cryptosporidium from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitology Research*, 101(6), 1575, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00436-007-0681-x>

LIMA, J. L.; PEIXOTO, J. D. D.; GERMANO, M. D. C. M.; LIMA, T. V.; BARREIRA FILHO, D. M. Identificação e susceptibilidade de microrganismo proveniente de uma unidade hospitalar pública. **Mostra Científica da Farmácia**, 3(1), 2017.

LUGARINI, C.; PRATES C.; SOUZA, A.E.B.A.; ROSSATO, R.; DIAS, F.F.;...; SILVEIRA, L.F. **Protocolo CEMAVE: Projeto de Monitoramento da Avifauna em Unidades de Conservação Federais do Bioma Caatinga**. ICMBio, 2014.

MADRID, D. M. D. C.; BASTOS, T. S. A.; JAYME, V. D. S. Emergência da criptosporidiose e impactos na saúde humana e animal. 2015.

MANGAN, A. M.; PEJCHAR, L. & WERNER, S. J. Bird use of organic apple orchards: Frugivory, pest control and implications for production. **PloS one**, 12(9), e0183405. 2017.

MARCON, A. P. Interações dos beija-flores e seus recursos florais em um ambiente antropizado no sul do Brasil. *Atualidades Ornitológicas*, 193, 18-24, 2016.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; MARTINS, T. F.; LIMA, E. T.; LOPES, R. S.; ANDREATTI FILHO, R. L. Prevalência de endoparasitas em amostras fecais de aves silvestres e exóticas examinadas no Laboratório de Ornitopatologia e no Laboratório de Enfermidades Parasitárias da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP. **Ciência Animal Brasileira**, 10(1), 349-354, 2009.

MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, 1(1), 95-102, 2005.

MEDEMA, G.; TEUNIS, P.; BLOKKER, M.; DEERE, D.; DAVISON, A.; CHARLES, P.; LORET, J. F. WHO guidelines for drinking water quality: Cryptosporidium. **WHO**, New York, 138, 2006.

MORAES, A. C. F. D.; SILVA, I. T. D.; ALMEIDA-PITITTO, B. D.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 58(4), 317-327, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002940>

MOXLEY, R. Família Enterobacteriaceae In: MCVEY, D.S.; KENEDDY, M.; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA., 2017. p. 55-63.

OLIVEIRA, J. H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, 32(8), 2142-2150, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800028>.

OLIVEIRA, A. B. A. D.; PAULA, C. M. D. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. D. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**. Porto Alegre. Vol. 30, n. 3 (Jul./set. 2010), p. 279-285, 2010.

PAINTER, J. E.; GARGANO, J. W.; YODER, J. S.; COLLIER, S. A.; HLAVSA, M. C. Evolving epidemiology of reported cryptosporidiosis cases in the United States, 1995–2012. **Epidemiology & Infection**, 144(8), 1792-1802, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268815003131>

PEREIRA, J. T.; SOCCOL, V. T.; COSTA, A. O.; CASTRO, E. A. D.; OSAKI, S. C.; PAULINO, R. C. Cryptosporidium spp.: para controlar é necessário conhecer. **Revista Saúde e Ambiente**, 10(2), 13-25, 2010.

PIACENTINI V.Q.; ALEIXO, A.L.P.; AGNE, C.E.Q.; MAURICÍO, G.N.; PACHECO F.; ...; CÉSARI E. Aves in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD, 2020. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/135125>>. Acesso em: 16 Mar. 2020

PRESCOTT, J.F. Patogenicidade e Virulência In: MCVEY, D.S.; KENEDDY, M.; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA., 2017. p. 26-44.

REGITANO J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34(3), 601-616, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000300002>.

RIBEIRO, E. S.; SOUZA, R. S.; MOREIRA, E. L.; PASA, M. C.; SOUZA, R. A. T. M. Contribuição das Plantas Frutíferas do Cerrado na Dieta das Aves e a Importância das Aves no Processo de Dispersão de Sementes. **Biodiversidade**. 2013.

RYAN, U. N. A.; FAYER, R.; XIAO, L. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, 141(13), 1667-1685, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1017/S0031182014001085>

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista científica do ITPAC**, 4(1), 40-49, 2011. DOI:

SATO, G.; OKA, C.; ASAGI, M.; ISHIGURO, N. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in Escherichia coli isolated from domestic and feral pigeons and crows. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: **Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie**, 241(4), 407-417, 1978.

SILVA J. C. R. Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres. **Portal Educação**. Mato Grosso do Sul 2005. Acesso em: 09 abr. 2020.

SMELTZER, M.S.; BEENKEN, K.E. Staphylococcus In: MCVEY, D.S.; KENEDDY, M.; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA., 2017. p. 189-198.

STROMMINGER, B.; LAYER, F.; WERNER, G. Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in workers in the food industry. In Staphylococcus aureus. **Academic Press** (pp. 163-188), 2018.

TODAR K., Todar`s online text book of bacteriology. 2011. Available From: <http://www.textbookofbacteriology.net>

TORRES, A. C. D.; D'APARECIDA, N. S.; HAAS, D. J. Principais zoonoses víricas, fúngicas e parasitárias de aves domésticas e silvestres. **Revista veterinária em foco**, 13(1), 2015.

UMARU, G. A.; KABIR, J.; UMOH, V. J.; BELLO, M.; KWAGA, J. K. P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in fresh and fermented milk in Zaria and Kaduna, **Nigeria**. **International Journal of Drug Research and Technology**, 3(3), 67-75, 2013.

WITTE, W.; STROMMINGER, B.; STANEK, C.; CUNY, C. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, Central Europe. **Emerging infectious diseases**, 13(2), 255, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Acesso em: 09 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zoonoses**. Disponível em:
<<https://www.who.int/topics/zoonoses/en/>> Acesso em: 09 abr. 2020.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **One Health**. Disponível em:
<<https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>> Acesso em: 09 abr. 2020.