

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

NAIARA AGUIAR SANTESTEVAN
Bióloga - UFRGS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Agosto de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

NAIARA AGUIAR SANTESTEVAN
Bióloga - UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Molecular de Procaríotos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Agosto de 2014

AGUIAR SANTESTEVAN, NAIARA

Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. / NAIARA AGUIAR SANTESTEVAN. -- 2014. 163 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Enterococcus* spp.. 2. lobos-marinhos. 3. *Arctocephalus* spp.. 4. resistência antimicrobiana. 5. fatores de virulência. I. Guedes Frazzon, Ana Paula, orient. II. Título.

NAIARA AGUIAR SANTESTEVAN
BIOTECNÓLOGA
UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

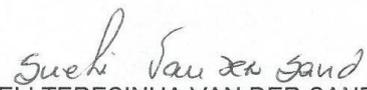
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

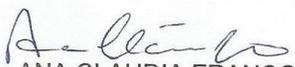
Porto Alegre (RS), Brasil

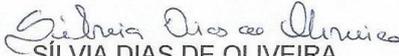
Aprovada em: 21/08/2014
Pela Banca Examinadora

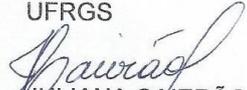
Homologado em: 26/02/2015
Por:


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
Orientadora-UFRGS


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA


ANA CLAUDIA FRANCO
UFRGS


SÍLVIA DIAS DE OLIVEIRA
PUCRS


JULIANA CAIERÃO
UFCSPA


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Se eu pudesse, deixaria aqui registrado o nome de cada amigo, cada colega, cada professor e familiar, dos mais próximos aos mais distantes, que me ajudaram a construir meu caminho, direta ou indiretamente. Para tanto, desejo aqui expressar meus agradecimentos a todos que tornaram esta jornada possível e aos que estiveram presentes, principalmente, ao longo desta etapa de crescimento pessoal e profissional. Por isso, agradeço e dedico:

A meus pais, **Vitor** e **Luiza**, pelo carinho e incentivo, e por permitirem minha total dedicação a este trabalho. À minha irmã **Vanessa**, por estar sempre ao meu lado. Tudo que faço em minha vida é por vocês.

Ao **Emanuel**, por todo o carinho, companheirismo e entrelaçamento quântico. Por me desconectar completamente do ambiente de trabalho e garantir meu entusiasmo.

À minha querida orientadora **Ana Paula Frazzon**, pela amizade e energia, e todos os ensinamentos além do trabalho. Por ser uma *chefa* incrível, estar sempre disponível para uma conversa e pelo carinho de mãe.

À melhor IC que eu poderia ter: **Dejoara**. Este trabalho é todo nosso! Obrigada pela tua dedicação e por entender as minhas manias.

Às gurias do Laboratório 209: **Francielle**, **Elisandra**, **Thaísa**, **Kimberly**, **Dejô** e todas as outras que passaram por lá... pela companhia no mate, pelas cantorias e coreografias, por compartilharem tantas dúvidas e alegrias, por tornarem tudo mais divertido. Em especial, a **Tiane**, **Daniele** e **Michele**, pelo auxílio no trabalho e na vida pessoal, pelas conversas, pela amizade. **Tiane**, tua parceria vai além da bancada e da pista de corrida! Obrigada por tudo. **Mica**, dona do coração mais puro! Obrigada por estar sempre presente. **Dani**, tua história e determinação me emocionam e inspiram. Sorte e sucesso a todas nós!

Às amadas loiras da UFCSPA, **Janira** e **Rebeca**. Há tanto tempo em minha vida! Obrigada pela amizade, pelas risadas e parceria em tantos momentos. Vocês são amigas especiais. Janirão, nossa amizade não tem definição.

A todo o pessoal do Laboratório 164: **Carol Comerlato**, **Fê Rossatto**, **Dani Oliveira**, **Mateus**. Em especial à **Jaqueline** e à **Aline**. O convívio com vocês foi revigorante.

Aos vizinhos ricos do Laboratório de Virologia. Especialmente à **Thalita** e à **Ju Comerlato**, por tanta doçura.

À toda equipe do CECLIMAR, pela atenção e concessão das amostras. Ao **Maurício Tavares** e ao **Derek Blaese**, pela disponibilidade e por sanar tantas dúvidas.

À Prof^a **Ana Cláudia Franco**, por deixar as portas do Laboratório de Virologia da UFRGS sempre abertas e ao Prof. **Pedro d'Azevedo**, pela concessão das dependências e de materiais da UFCSPA.

À turma do *jump*, *bodypump* e *matpilates*: obrigada por me tirarem da frente do computador! Vocês foram fundamentais, principalmente na etapa de escrita, para manter meu corpo em movimento e minha mente descansada.

Aos amigos, familiares e colegas que me ajudam e me inspiram: **Gabi Klein** (sin-to-ni-a), **Pati** e **Lilly**, afilhadas **Mariana** e **Elisa**, família Hollenbach, cunhados(as), tios(as) e primos(as).

Às minhas avós **Nair** e **Iara**. Estarão para sempre marcadas em meu nome e em minhas melhores lembranças.

Nem toda palavra é
Aquilo que o dicionário diz
Nem todo pedaço de pedra
Se parece com tijolo ou com pedra de giz

Avião parece passarinho
Que não sabe bater asa
Passarinho voando longe
Parece borboleta que fugiu de casa

Borboleta parece flor
Que o vento tirou pra dançar
Flor parece a gente
Pois somos semente do que ainda virá

A gente parece formiga
Lá de cima do avião
O céu parece um chão de areia
Parece descanso pra minha oração

A nuvem parece fumaça
Tem gente que acha que ela é algodão
Algodão as vezes é doce
Mas as vezes é doce não

Sonho parece verdade
Quando a gente esquece de acordar
E o dia parece metade
Quando a gente acorda e esquece de levantar
[...]

**Descobrir o verdadeiro sentido das coisas
É querer saber demais**
[...]

– O Teatro Mágico, *Sonho de Uma Flauta*.

Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor: Naiara Aguiar Santestevan¹

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

A distribuição das espécies de enterococos, bactérias comensais do trato gastrointestinal (TGI), é bastante estudada nos diferentes mamíferos; entretanto, em lobos-marinhos (*Arctocephalus* spp.) ainda não existem dados. Os objetivos do estudo foram: a) isolar *Enterococcus* spp. a partir de amostras fecais de lobos-marinhos encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul; b) determinar a prevalência das espécies; c) avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana; d) verificar a presença de genes relacionados à resistência e à virulência e; e) analisar o perfil genotípico por RAPD-PCR. No total, 160 enterococos foram isolados e identificados como *E. faecalis* (50,62%), *E. hirae* (34,37%), *E. casseliflavus* (11,87%), *E. gallinarum* (1,87%), *E. mundtii* (0,62%) e *E. faecium* (0,62%). Noventa e três isolados foram sensíveis aos dez antimicrobianos testados. As propriedades de resistência foram encontradas para eritromicina (21,25%), nitrofurantoína (15,62%), tetraciclina (6,25%), norfloxacin (3,12%) e ciprofloxacina (3,12%). Dentre os 10 isolados resistentes à tetraciclina, 3 apresentaram o gene *tet(M)* e nenhum o *tet(L)*. Dos 34 resistentes à eritromicina, 2 apresentaram o gene *erm(B)*. Quanto à presença dos genes de virulência, maior incidência foi observada para os genes *ace* (66,87%) e *gelE* (50,62%), seguidos por *asa* (11,87%) e *cylA* (2,5%). A atividade de gelatinase e citolisina indicou a presença de genes silenciosos. A análise do RAPD-PCR permitiu reunir os isolados em cinco grupos. Em conclusão, diferentes espécies de enterococos compõem a microbiota do TGI de lobos-marinhos e a presença de elementos de resistência e virulência podem estar relacionados a fatores antropogênicos ou ter origem no resistoma ambiental.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (163 p.) Agosto, 2014.

Isolation and evaluation of *Enterococcus* spp. from fecal samples of fur seals (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) from the North coast of Rio Grande do Sul, Brazil.

Author: Naiara Aguiar Santestevan¹

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

The species distribution of enterococci, commensal bacteria of the gastrointestinal tract (GIT), is well studied in different mammals, however in fur seals (*Arctocephalus* spp.) data do not exist yet. The objectives of this study were: a) to isolate *Enterococcus* spp. from fecal samples of fur seals found on the North coast of Rio Grande do Sul; b) to determine the prevalence of species; c) to assess the antimicrobial susceptibility profile; d) to check the presence of resistance and virulence related genes and; e) to evaluate the genotypic profile by RAPD-PCR. A total of 160 enterococci were isolated and identified as *E. faecalis* (50.62%), *E. hirae* (34.37%), *E. casseliflavus* (11.87%), *E. gallinarum* (1.87%), *E. mundtii* (0.62%), and *E. faecium* (0.62%). Ninety-three isolates were susceptible to 10 antimicrobials tested. Resistance properties were found for erythromycin (21.25%), nitrofurantoin (15.62%), tetracycline (6.25%), norfloxacin (3.12%), and ciprofloxacin (3.12%). Among the 10 isolates resistant to tetracycline, 3 harbored the *tet*(M) gene and none were positive to *tet*(L) gene. Among the 34 erythromycin-resistant isolates, 2 harbored the *erm*(B) gene. Regarding the virulence genes, a higher incidence was observed for the *ace* (66.87%) and *gelE* (50.62%), followed by *asa* (11.87%) and *cylA* (2.5%). Gelatinase and cytolysin activity indicated the presence of silent genes. Analysis of RAPD-PCR allowed to assemble the isolates into five groups. In conclusion, different species of enterococci are part of the fur seals GIT microbiota and the presence of resistance and virulence elements may be related to anthropogenic factors or origin in the environmental resistome.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (163 p.) August, 2014.

Sumário

RELAÇÃO DE TABELAS.....	XIII
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	XIV
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Mamíferos Marinhos.....	5
2.1.1 Os Pinípedes.....	9
2.1.2 <i>Arctocephalus australis</i> (Zimmermann, 1783).....	12
2.1.3 <i>Arctocephalus tropicalis</i> (Gray, 1872).....	15
2.2 O Gênero <i>Enterococcus</i>	17
2.2.1 Taxonomia.....	18
2.2.2 Descrição do gênero <i>Enterococcus</i>	19
2.3 Ecologia de <i>Enterococcus</i> spp.....	21
2.4 Resistência Antimicrobiana.....	26
2.4.1 β -lactâmicos.....	28
2.4.2 Aminoglicosídeos.....	29
2.4.3 Glicopeptídeos.....	29
2.4.4 Macrolídeos.....	31
2.4.5 Quinolonas.....	32
2.4.6 Cloranfenicol.....	32
2.4.7 Nitrofurantoína.....	33
2.4.8 Tetraciclina.....	33
2.5 Fatores de Virulência.....	34
2.5.1 Adesinas.....	35
2.5.1.1 Substância de agregação.....	36
2.5.1.2 Adesina de colágeno.....	37

2.5.2 Citolisina	38
2.5.3 Gelatinase.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Coleta das amostras	42
3.2 Processamento das amostras e isolamento de <i>Enterococcus</i> spp.	43
3.2.1 Teste da hidrólise da esculina na presença de sais biliares	44
3.2.2 Teste da catalase.....	45
3.2.3 Armazenamento dos isolados bacterianos	45
3.3 Extração do DNA total	46
3.4 Confirmação do gênero <i>Enterococcus</i> por PCR	46
3.5 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. por PCR Multiplex.....	47
3.6 Testes bioquímicos	48
3.6.1 Teste de fermentação de açúcares.....	49
3.6.2 Hidrólise da arginina	49
3.6.3 Produção de pigmento	50
3.6.4 Utilização do piruvato.....	50
3.7 Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA	51
3.8 Testes de suscetibilidade antimicrobiana	52
3.9 Verificação da presença dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i> relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina.....	53
3.10 Detecção dos fatores de virulência <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i>	54
3.11 Detecção da produção da enzima gelatinase	55
3.12 Detecção da enzima citolisina.....	56
3.13 RAPD-PCR	56
4. RESULTADOS.....	58
4.1 Isolamento e incidência das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. em amostras fecais de lobos-marinhos	58
4.1.1 <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos..	58
4.1.2 Identificação das espécies por PCR Multiplex	61
4.1.3 Confirmação do gênero pela detecção do gene <i>tuf</i>	63
4.1.4 Identificação bioquímica das espécies.....	63
4.1.5 Análise do sequenciamento	64

4.1.6 Distribuição das espécies	65
4.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	66
4.2.1 Presença dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i> relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina	68
4.3 Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados	69
4.3.1 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina	71
4.4 Relação entre perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência	71
4.5 Correlação filogenética das espécies por RAPD-PCR	73
4.5.1 Avaliação entre os isolados de cada amostra	73
4.5.2 Avaliação da correlação das espécies de enterococos isolados de diferentes amostras	78
5. DISCUSSÃO	82
5.1 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp. em amostras fecais de lobos-marinhos	82
5.2 Prevalência das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. nas amostras fecais de lobos-marinhos	87
5.3 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	94
5.4 Presença dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i> relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina	107
5.5 Distribuição dos fatores de virulência entre os enterococos	109
5.6 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina	116
5.7 Relação entre perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência	119
5.8 Correlação filogenética das espécies de enterococos por RAPD-PCR	124
6. CONCLUSÃO	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
8. APÊNDICES	146

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de pinípedes mais frequentemente encontradas no litoral brasileiro e no Rio Grande do Sul.....	11
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (<i>tuf</i>) e espécie-específicos (<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i> e <i>E. gallinarum</i>) e tamanhos dos fragmentos gerados.....	48
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i>	54
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>gelE</i> (gelatinase), <i>cylA</i> (citolisina), <i>ace</i> (adesina de colágeno) e <i>asa</i> (substância de agregação)..	55
Tabela 5. Informações de coleta referentes aos lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) utilizados no estudo.....	60
Tabela 6. Número de isolados de enterococos identificados por amostra pela técnica de PCR Multiplex.....	62
Tabela 7. Características fenotípicas de <i>Enterococcus</i> spp. isolados de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	64
Tabela 8. Isolados selecionados para sequenciamento e características fenotípicas de <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	65
Tabela 9. Distribuição dos padrões de resistência antimicrobiana a partir do número de isolados de cada espécie com algum nível de resistência, em <i>Enterococcus</i> spp. obtidos das amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	67
Tabela 10. Presença e ausência dos genes <i>tet(L)</i> e <i>tet(M)</i> em <i>E. hirae</i> resistentes à tetraciclina, obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	68
Tabela 11. Distribuição dos genes de virulência <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i> , entre as espécie de <i>Enterococcus</i> spp. obtidos das amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	69

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos pinípedes: reprodução durante a permanência em terra e migrações durante o outono, inverno e parte da primavera para alimentação.....	10
Figura 2: Exemplares de lobo-marinho-sul-americano, <i>Arctocephalus australis</i> . Em (a), vista frontal de juvenil em boa condição corporal e em (b), espécime em perfil.....	13
Figura 3: Distribuição geográfica do lobo-marinho-sul-americano, <i>Arctocephalus australis</i> , realçada em azul escuro.....	14
Figura 4: Exemplar de lobo-marinho-subantártico, <i>Arctocephalus tropicalis</i>	16
Figura 5: Distribuição geográfica do lobo-marinho-subantártico, <i>Arctocephalus tropicalis</i>	17
Figura 6: Acúmulo de espécies de <i>Enterococcus</i> spp. identificadas até o ano de 2012. As barras vermelhas mostram o número de espécies associadas com doenças humanas.....	23
Figura 7: Dois exemplares de <i>Arctocephalus australis</i> encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul, em Palmares do Sul e Torres, respectivamente; (a) amostra J [G1508] e (b) amostra B [G1544].....	58
Figura 8: Gel de agarose da reação de PCR para o gene <i>tuf</i> (112 pb). Controles: (C+) <i>E. faecium</i> SS1274, (C+) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular de 100 pb.....	63
Figura 9: Percentual de espécies de enterococos da microflora intestinal de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.), calculado sobre o total de isolados (n=160) de <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais destes animais, encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	66
Figura 10: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra B , de <i>A. australis</i> . M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	73
Figura 11: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra C , de <i>A. australis</i> . M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	74

Figura 12: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra D , de <i>A. australis</i> . (1233) Controle interno. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	74
Figura 13: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra E , de <i>A. australis</i> . (623) Controle interno. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	75
Figura 14: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra F , de <i>A. tropicalis</i> . (a) <i>E. gallinarum</i> representados pelos isolados F1, F3 e F4; <i>E. hirae</i> representado pelos isolados F2, F5, F6, F7 e F8. (b) <i>E. faecium</i> representado pelo isolado F12; <i>E. hirae</i> representado pelos isolados F13 e F14. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	76
Figura 15: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra G , de <i>A. australis</i> . M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	76
Figura 16: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra J , de <i>A. australis</i> . J1-J4, J6-J11 = <i>E. casseliflavus</i> ; J5 = <i>E. mundtii</i> . M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	77
Figura 17: Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra L , de <i>A. australis</i> . M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.....	78
Figura 18: Dendrograma (Programa Past.exe) obtido pela técnica de RAPD-PCR, após análise em gel de agarose e detecção de fragmentos pelo programa Gel-Pro Analyzer, para <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: <i>Arctocephalus</i> spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Grupos I, II, III, IV e V organizados conforme índice de similaridade de Jaccard.....	81

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: microgramas
µL: microlitro
µM: micromolar
Ace: Adesina de Colágeno
ace: gene responsável pela codificação da proteína Ace
Agg: Substância de Agregação
AMP: Ampicilina
ARA: arabinose
ARG: arginina
asa: gene associado à codificação da proteína Agg
ATCC: American Type Culture Collection
BHI: “Brain Heart Infusion”
CIP: Ciprofloxacina
CLO: Cloranfenicol
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
cm: centímetro
CyIA: enzima citolisina
cyIA: gene da enzima citolisina
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERI: Eritromicina
erm(B): gene relacionado ao mecanismo de resistência à eritromicina
esp: gene responsável por codificar a proteína de superfície de *Enterococcus*
EST: Estreptomicina
EUA: Estados Unidos da América
GeIE: enzima gelatinase
geIE: gene da enzima gelatinase
GEN: Gentamicina
h: hora
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IUCN: União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
Kg: quilograma
Km: quilômetro
K₂HPO₄: Fosfato de Potássio Dibásico
LAB: bactérias ácido-láticas
M: marcador
MAN: manitol
mg: miligramas
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MGP: metil-α-D-glicopiranosídeo
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
NaCl: Cloreto de Sódio
NaOH: Hidróxido de Sódio

ng: nanogramas
NIT: Nitrofurantoína
NOR: Norfloxacina
°C: graus Celsius
p.: página
pb: pares de base
PBP: proteína de ligação de penicilinas
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PIR: Piruvato
PYR: L-pirrolidonil-β-naftilamida
RAF: rafinose
RAPD: “Random Amplified Polymorphic DNA”
RNA: Ácido Ribonucléico
rpm: rotações por minuto
rRNA: Ácido Ribonucléico Ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
SAC: sacarose
SBL: sorbitol
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SOR: sorbose
TAE: Tampão Tris-Ácido Acético-EDTA
Taq: enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris-EDTA
TEL: telurito
tet(L): gene relacionado ao mecanismo de resistência à tetraciclina
tet(M): gene relacionado ao mecanismo de resistência à tetraciclina
TET: Tetraciclina
U: Unidade
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UV: Luz Ultravioleta
VAN: Vancomicina
VRE: enterococos vancomicina resistentes

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a zona costeira apresenta grande diversidade de mamíferos marinhos, dos quais, os pinípedes representam um grupo significativo de carnívoros marinhos. O litoral do Rio Grande do Sul, devido à influência de correntes marítimas, é uma área de concentração sazonal destes animais, que chegam ao litoral principalmente para descansar. Até o momento, há registros de sete espécies de pinípedes, sendo o leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*) o mais frequentemente observado, seguido das espécies de lobos-marinhos *Arctocephalus australis* e *Arctocephalus tropicalis*, demonstrando a importância deste cenário no desenvolvimento e ciclo de vida destes animais.

O ecossistema marinho, habitat desses mamíferos, pode ser considerado um meio de propagação de poluentes. Assim, a contaminação das águas costeiras por micro-organismos dotados de características adquiridas em outros ambientes pode interferir nas populações microbianas nativas. Sob essa perspectiva, o estudo de micro-organismos desse ambiente permite inferir sobre as condições dos animais marinhos e do ambiente como um todo.

Os *Enterococcus* spp. são ubíquos no ambiente e, segundo evidências filogenéticas e moleculares, o gênero é composto por mais de 40

espécies, distribuídas amplamente na natureza. São frequentemente isolados de fontes como solo, água, plantas e alimentos, ao passo que em seres humanos e outros animais são considerados membros naturais da microbiota gastrointestinal. Contudo, a distribuição das espécies pode variar de acordo as características individuais de cada espécime (ex. idade, sexo), do habitat (ex. variações sazonais, dieta) e da localização geográfica.

Embora determinadas cepas sejam utilizadas benéficamente na indústria alimentícia e farmacêutica, algumas espécies, especialmente *Enterococcus faecalis*, são frequentemente utilizadas como indicadores da poluição fecal da água, além de serem constantemente identificadas como agentes de infecções humanas. Em paralelo, o surgimento da resistência a antimicrobianos pode ter origem no uso indiscriminado destes compostos, levando à seleção de genes resistentes e conduzindo ao aparecimento de linhagens com estas características em outros locais.

Não obstante, além de serem considerados reservatórios de genes de resistência, os enterococos possuem propriedades adaptativas que facilitam a sobrevivência em condições consideradas adversas para outros microorganismos. Nesse sentido, faz-se necessária a investigação dos perfis e mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana, bem como a identificação dos fatores de virulência relacionados ao estabelecimento de populações microbianas nos mais diversos nichos.

Uma maneira de disseminar bactérias resistentes em águas marinhas seria através da contaminação dos efluentes urbanos, de forma a contaminar os animais que habitam e/ou se aproximam destes ambientes.

Apesar do crescente número de estudos com amostras de água e sedimentos aquáticos, a utilização de amostras de animais marinhos que não tenham sofrido intervenções em centros de reabilitação ainda é escassa. Pesquisas empregando animais marinhos silvestres não são muito noticiadas, provavelmente, devido à dificuldade em se obter amostras dos ambientes marinhos. Diante disso, a análise dos enterococos como um grupo de bactérias com importância clínica e ambiental, e que já teve sua composição averiguada e monitorada em diferentes habitats, pode apontar aspectos importantes a respeito das interações e distúrbios ambientais.

Para tanto, o presente estudo buscou examinar populações de enterococos isoladas do material fecal de lobos-marinhos. A relevância do estudo está em investigar um gênero que compõe a microbiota de uma série de animais, participando do equilíbrio dos ambientes os quais integram, e inferir sobre possíveis vias de disseminação microbiana, sendo este um material de difícil obtenção.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi o de isolar micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. de amostras fecais de lobos-marinhos encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul. Além disso, buscou-se determinar a prevalência das espécies e suas características quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, a presença de genes envolvidos com fatores de virulência, bem como analisar o perfil genotípico dos isolados.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. de amostras de fezes de lobos-marinhos;
- Confirmar o gênero *Enterococcus* spp. por PCR gênero-específico e determinar a prevalência das espécies de enterococos por PCR Multiplex, empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, e por provas bioquímicas;
- Caracterizar os padrões de suscetibilidade antimicrobiana e pesquisar, nos isolados com fenótipo resistente à eritromicina e/ou à tetraciclina, os genes *erm(B)*, *tet(L)* e *tet(M)*, associados a mecanismos de resistência a estes antimicrobianos;
- Detectar os genes *ace*, *gelE*, *cyIA* e *asa*, envolvidos na virulência de *Enterococcus* spp., e relacionar a presença dos genes *gelE* e *cyIA* com suas expressões fenotípicas de gelatinase e citolisina;
- Correlacionar os perfis genotípicos dos isolados obtidos pela técnica de RAPD-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mamíferos Marinhos

A costa brasileira se estende pelo Oceano Atlântico cobrindo 7.367 Km, compreendendo uma faixa de 200 milhas náuticas a partir de sua orla marítima, denominada Zona Econômica Exclusiva (ZEE) (IBGE, 2014). A biodiversidade observada nas águas brasileiras deve-se à influência de três correntes oceânicas: das Guianas, do Brasil e das Malvinas (ECOMAMA, 2014). A elevada diversidade biológica ao longo da costa brasileira é reconhecida por cerca de cinquenta espécies de mamíferos marinhos que habitam ou frequentam a Zona Marítima Brasileira (Machado, 2006). Esta variedade se distribui em três grupos taxonômicos: a Ordem Cetacea (baleias, golfinhos e botos), a Ordem Sirenia (peixes-boi) e a Subordem Pinnipedia (focas, morsas, lobos-, leões- e elefantes-marinhos) (Zerbini et al., 1999).

No Brasil, os dados referentes a estes animais são o resultado de monitoramentos de encalhe, avistagens costeiras e oceânicas, projetos de estudo sobre a natureza de populações costeiras e monitoramento de atividades impactantes. Os monitoramentos de encalhe são a principal forma de obtenção de informações sobre ocorrência, biologia e ecologia da

maioria das espécies de mamíferos marinhos que encalham ou que repousam no litoral. Este tipo de atividade pode ser categorizada de acordo com sua frequência, em esforço sistemático, ocasional ou inexistente (Zerbini et al., 1999).

Além do acompanhamento periódico, chamadas realizadas pela população contribuem para que animais avistados fora da rotina dos monitoramentos sejam amparados. Grande parte dos animais que chegam ao litoral sul-rio-grandense busca local para descansar, podendo permanecer até 72 horas fora da água. Como não há a intenção de reproduzir neste cenário e nem a busca por alimento em terra, a retirada do ambiente natural pode interferir no ciclo de vida e no processo de seleção natural do animal, podendo levá-lo a óbito (CECLIMAR, 2014).

A maioria dos Estados brasileiros tem sua costa monitorada, no entanto, em virtude da falta de esforço ou de áreas de difícil acesso, ainda existem regiões sem cobertura. No Rio Grande do Sul, toda a extensão litorânea é sistematicamente monitorada (Zerbini et al., 1999). Por se tratar de uma área de concentração sazonal de pinípedes, ações que visam o acompanhamento destes animais têm sido desenvolvidas a fim de reunir informações ainda consideradas escassas e imprecisas. Em 2003, o Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS) iniciou o projeto de marcação e soltura de pinípedes que passam pelo setor de reabilitação do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR). Nele, os animais recuperados são anilhados antes da soltura e, quando são encontrados novamente, as informações contidas na anilha

permitem o contato com os pesquisadores e o delineamento de características específicas deste animal após o retorno ao ambiente. Este projeto também coleta dados dos animais durante o período de recuperação, ou mesmo dos animais que são encontrados mortos, permitindo, desta forma, investigar e correlacionar diferentes áreas de estudo (CECLIMAR, 2014).

Recentemente, Alfonsini et al. (2013) investigaram o uso de técnicas moleculares como ferramentas rápidas para o monitoramento da biodiversidade de mamíferos marinhos encalhados na França. Dessa maneira, a utilização da biologia molecular, juntamente com dados fisiológicos, ecológicos e etológicos, aparece como uma ferramenta indispensável no estudo da variabilidade genética e da problemática da conservação de espécies ameaçadas (Heinzelmann, 2002).

No Brasil, embora seja possível observar um aumento na incidência de pinípedes na costa, podendo haver relação com o aumento populacional, a exploração como recurso de subsistência, a caça comercial (mesmo proibida, pode indiretamente ser uma ameaça por competição de recursos e capturas incidentais), a degradação do ambiente costeiro, o turismo ecológico sem restrições e o aquecimento global, são algumas das principais ameaças à sobrevivência destes animais, estando todas elas relacionadas a ações antrópicas (Rocha-Campos et al., 2011; Oliveira, 2013). Sabe-se, por exemplo, que alterações ecológicas e climáticas podem alterar a composição alimentar de algumas espécies e, conseqüentemente, afetar a saúde (propensão a doenças) das populações (Pereira et al., 2008; Hill et al., 2013).

O monitoramento destes animais tem também como objetivo identificar e acompanhar as consequências da interferência antrópica sob as populações de mamíferos marinhos. A intervenção das atividades pesqueiras no ciclo de pinípedes é observada no litoral do Rio Grande do Sul principalmente nos meses de inverno e primavera. As capturas acidentais destes animais são raramente reportadas e a única espécie que comprovadamente interage com atividades pesqueiras é o leão-marinho-sul-americano. Ao mesmo tempo, o molestamento de lobos-marinhos encontrados em praias é observado apesar da proibição pela Lei Federal nº 7.643 de 1987 (Zerbini et al., 1999).

Diversas são as formas de degradação do ecossistema marinho, dentre estas é importante destacar a poluição química (óleo e derivados, compostos organopersistentes, metais pesados, despejo de esgoto e escoamento de resíduos da agricultura) e sonora (obras de engenharia costeira e oceânica e exploração de petróleo), bem como o tráfego de embarcações e o desenvolvimento das regiões costeiras, ocasionando o declínio dos recursos e a exposição a substâncias tóxicas que podem afetar negativamente a sobrevivência dos animais marinhos (Zerbini et al., 1999; Pereira et al., 2008). Todas estas atividades podem interferir no uso de áreas preferenciais das espécies costeiras e, embora a Lei de Proteção à Fauna Silvestre (Lei 5.197 de 1967) proteja os animais marinhos de intervenções antrópicas (Zerbini et al., 1999), as medidas contrárias ao desenvolvimento econômico destas áreas costumam ser adotadas somente após agressão direta ao ambiente.

Conhecido como um habitat natural de micro-organismos patogênicos (Pereira et al., 2008), a contaminação das águas costeiras ocorre a partir de uma variedade de fontes, incluindo o despejo de esgotos residenciais, industriais e hospitalares. Neste caso, o sistema aquoso funciona como uma via de transporte de poluentes microbiológicos (bactérias, vírus e protozoários), carreadores de traços adquiridos em outros ambientes seletivos, e com potencial patogenicidade para seres humanos e outros animais (Stewart et al., 2014). As doenças infecciosas causadas por esses patógenos podem afetar várias espécies de modo a levá-las ao *status* de ameaçadas. Sob essa perspectiva, segundo Pereira et al. (2008), alguns agentes biológicos isolados a partir destes animais poderiam ser utilizados como indicadores de perturbação do ecossistema marinho. Stewart et al. (2014) relatam que, atualmente, não se sabe muito sobre patógenos que colonizam mamíferos marinhos na natureza principalmente devido aos hábitos migratórios de algumas espécies e pela dificuldade em se obter amostras, uma vez que muitos dos estudos existentes são realizados com animais presos.

2.1.1 Os Pinípedes

Os pinípedes dividem-se em três famílias: Otariidae (lobos e leões-marinhos; 14 espécies), Odobenidae (morsas; 1 espécie) e Phocidae (focas e elefantes-marinhos; 19 espécies) (Zerbini et al., 1999; Oliveira, 2013). Apesar de extensas discussões relativas à taxonomia dos Pinnipedia, muitos estudos corroboram com sua identidade e classificam-nos como um grupo monofilético de mamíferos carnívoros (Higdon et al., 2007), considerando este um táxon válido, seja como uma subordem dentro de Carnivora, seja como uma ordem à

parte (Drehmer, 2005). Neste trabalho, será considerada a seguinte divisão taxonômica: Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Carnivora, Subordem Pinnipedia.

As 34 espécies de pinípedes representam os carnívoros marinhos que, diferentemente dos carnívoros terrestres, realizam etapas como reprodução, troca de pelos e descanso em terra ou gelo, mas que também passam grande parte de seu desenvolvimento no mar, se alimentando ou se deslocando (Figura 1) (Higdon et al., 2007; Oliveira, 2013).



Figura 1. Ciclo de vida dos pinípedes: reprodução durante a permanência em terra e migrações durante o outono, inverno e parte da primavera para alimentação. Fonte: adaptado de Fundación Mundo Marino.

O termo pinípede (do *latim*, pés em forma de pena ou asa) refere-se a animais cujos membros anteriores e posteriores são modificados em nadadeiras, com extensas membranas interdigitais que auxiliam a locomoção na água (Oliveira, 2013). A movimentação deste grupo difere entre as famílias de acordo com a forma como utilizam as nadadeiras. Enquanto os membros da família Phocidae utilizam as nadadeiras traseiras e, devido à impossibilidade de rodá-las para frente, locomovem-se em terra por ondulação sagital do corpo, nas famílias Otariidae e Odobenidae a locomoção é considerada ambulatorial, visto que utilizam as nadadeiras dianteiras (Barreto, 2001).

As necessidades ecológicas de uma espécie determinam sua distribuição, como por exemplo, substrato para reprodução, disponibilidade de recursos e padrões de temperatura da água (Barreto, 2001). Na América do Sul e no Brasil, há registros de ocorrência das famílias Otariidae e Phocidae. No Brasil, embora não existam colônias reprodutivas, com a chegada do inverno e a maior influência da Corrente das Malvinas, chegam à costa brasileira águas mais frias e, em busca destas condições, entre os meses de outono e primavera, são observados os deslocamentos de inúmeros visitantes sazonais no litoral do Rio Grande do Sul, assim como ilustrado anteriormente na Figura 1 (Rocha-Campos et al., 2011; Oliveira, 2013).

No litoral brasileiro há o registro de sete espécies de pinípedes (Tabela 1), todas de ocorrência também no litoral do Rio Grande do Sul. As espécies sul-americanas possuem marcada sazonalidade, enquanto as espécies antárticas e subantárticas têm sido consideradas ocasionais ou consequência de movimentos erráticos (Rocha-Campos et al., 2011).

Tabela 1. Espécies de pinípedes mais frequentemente encontradas no litoral brasileiro e no Rio Grande do Sul. Fonte: Rocha-Campos et al., 2011.

Frequência (ocorrência)	Nome popular	Nome científico
1º	Leão-marinho-sul-americano	<i>Otaria flavescens</i>
2º	Lobo-marinho-sul-americano	<i>Arctocephalus australis</i>
3º	Lobo-marinho-subantártico	<i>Arctocephalus tropicalis</i>
4º	Lobo-marinho-antártico	<i>Arctocephalus gazella</i>
5º	Elefante-marinho-do-sul	<i>Mirouga leonina</i>
6º	Foca-caranguejeira	<i>Lobodon carcinophaga</i>
7º	Foca-leopardo	<i>Hydrurga leptonyx</i>

Lobos- e leões-marinhos podem ser confundidos quando jovens, mas são facilmente diferenciados através de algumas características externas. De coloração entre amarelo-claro e marrom-avermelhado, os leões-marinhos apresentam focinho e orelhas pequenos e arredondados. Os machos, quando atingem a maturidade sexual, desenvolvem uma juba ao redor do pescoço e emitem sons graves, similares aos dos leões terrestres, e raramente param na orla, pois costumam descansar em ilhas. No Rio Grande do Sul, costumam ser avistados na Ilha dos Lobos, no município de Torres, e nos Molhes da Barra de Rio Grande. Já os lobos-marinhos possuem um focinho mais pontiagudo, estreito e alongado, e orelhas mais finas e compridas quando comparado ao leão-marinho. Costumam ser mais avistados pela população devido ao hábito de parar na orla para descansar, havendo registros de três espécies no RS (Rocha-Campos et al., 2011; CECLIMAR, 2014). Neste trabalho, serão abordadas duas espécies de lobos-marinhos destacadas a seguir: *Arctocephalus australis* (lobo-marinho-sul-americano) e *Arctocephalus tropicalis* (lobo-marinho-subantártico).

2.1.2 *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783)

Segundo a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2013) para espécies ameaçadas de extinção, *A. australis* é considerada de baixo risco. Da mesma forma, no Estado do Rio Grande do Sul, esta espécie não está sob ameaça (Oliveira, 2013). Entretanto, foi um dos pinípedes que mais sofreu com a caça desde o século XVI até 1991, quando a pesca era permitida em países como o Uruguai, para exploração direta e comercialização de pele, ossos,

carne e genitália (machos). Atualmente, encontra-se protegida ao longo de toda a sua distribuição (Oliveira, 2013; Rocha-Campos et al., 2011).

O lobo-marinho-sul-americano (Figura 2) apresenta coloração da pelagem entre marrom-escuro e marrom acinzentada. De porte médio, é possível observar dimorfismo sexual referente ao tamanho e ao peso destes animais: machos adultos podem atingir comprimento de até 200 cm e peso de 200 kg; já as fêmeas se apresentam de tamanho reduzido, raramente ultrapassando 140 cm e 60 kg (Vaz-Ferreira & Leon, 1987; Oliveira, 2013; CECLIMAR, 2014).



Figura 2. Exemplos de lobo-marinho-sul-americano, *Arctocephalus australis*. Em (a) vista frontal de juvenil em boa condição corporal (Fonte: arquivo GEMARS) e em (b) espécime em perfil (Fonte: www.arkive.org; fotógrafo: Martin Zwick).

Estima-se um tamanho populacional entre 300.000 e 450.000 indivíduos na América do Sul (Oliveira, 2013). A distribuição geográfica (Figura 3) compreende, no Oceano Pacífico, desde o Peru até o norte do Chile e mais ao sul, desde o Chile médio (32° Sul) até o extremo-sul do Chile; no Oceano Atlântico, desde o extremo sul da Argentina até o sul do Brasil (Ilha dos Lobos), incluindo as Malvinas (Drehmer, 2005). As espécies encontradas no Rio Grande do Sul são consideradas da população do Atlântico, visto que

apresentam variações genéticas em relação à população do Pacífico, apesar de ambas pertencerem à mesma espécie (Rocha-Campos et al., 2011; Oliveira, 2013).

Durante o verão do Hemisfério Sul (entre novembro e janeiro), estes animais se reúnem nas colônias reprodutivas localizadas, principalmente, em ilhas no Uruguai, Argentina, Ilhas Malvinas, Chile e Peru. Com mais de 150.000 indivíduos, a Ilha dos Lobos, no Uruguai, concentra a maior colônia reprodutiva desta espécie. A maturidade sexual é alcançada entre dois e quatro anos, pelas fêmeas, e entre cinco e seis anos para os machos (Vaz-Ferreira & Leon, 1987; Oliveira, 2013).

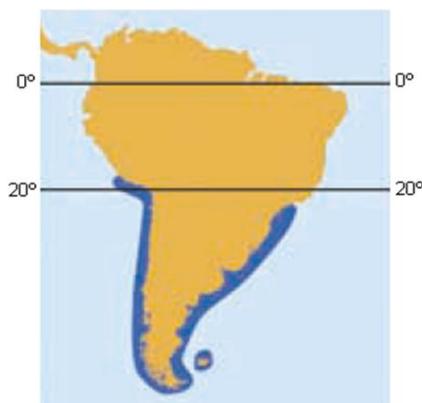


Figura 3. Distribuição geográfica do lobo-marinho-sul-americano, *Arctocephalus australis*, realçada em azul escuro. Fonte: Bastida et al. (2007) *apud* Rocha-Campos et al. (2011).

A migração dos lobos-marinhos-sul-americanos é influenciada pelas correntes marítimas e pelo seu hábito pelágico, que acaba promovendo o deslocamento, principalmente de jovens (de ambos os sexos) fora do período reprodutivo, em busca de comida (composta principalmente por peixes pelágicos e cefalópodes), e eventualmente culminando em paradas em terra

para descanso de alguns destes animais (Rocha-Campos et al., 2011; Oliveira, 2013). No Rio Grande do Sul, as Unidades de Conservação (Refúgio da Vida Silvestre) Ilha dos Lobos, em Torres, e Molhe Leste da Lagoa dos Patos, em São José do Norte, são as principais áreas de concentração invernal (Rocha-Campos et al., 2011; Oliveira, 2013).

2.1.3 *Arctocephalus tropicalis* (Gray, 1872)

Considerada de baixa preocupação pela Lista Vermelha da IUCN (2013) para espécies ameaçadas de extinção, *A. tropicalis*, da mesma forma que *A. australis*, enfrentou maiores problemas de conservação no passado, relativos à pesca, estando atualmente legalmente protegida (Oliveira, 2013).

A coloração pardo-amarelada presente no peito, pescoço e face, e as vibrissas brancas, permitem a diferenciação das demais espécies (Figura 4). Além disso, os machos adultos apresentam uma mecha de pelos no topo da cabeça, semelhante a um topete, e podem medir entre 180-200 cm e pesar 160 kg, enquanto as fêmeas medem entre 135-150 cm de comprimento total e pesam entre 50 e 55 kg. A maturidade sexual é atingida entre quatro e seis anos, para as fêmeas, e entre quatro e oito anos, para os machos, mas comumente a reprodução ocorre após os nove anos. A reprodução ocorre nas colônias reprodutivas durante os meses de verão (novembro e janeiro), assim como *A. australis*, quando os indivíduos se reúnem nas colônias. A alimentação é composta, basicamente, por cefalópodes e peixes teleósteos (Bester, 1987; Oliveira, 2013).



Figura 4. Exemplar de lobo-marinho-subantártico, *Arctocephalus tropicalis*. Fonte: www.arkive.org; fotógrafo: Vincent Bretagnolle.

A distribuição geográfica (Figura 5) compreende as ilhas oceânicas do Atlântico e do Índico ao norte da Convergência Antártica: Tristão da Cunha, Gough, Marion, Príncipe Edward, Crozet, Amsterdam, Saint Paul e Macquarie (Drehmer, 2005). A espécie habita principalmente as ilhas ao norte da Convergência Antártica, sendo que as colônias reprodutivas mais próximas da costa sul do Brasil estão localizadas a 4.200 km, nas ilhas Tristão da Cunha e Gough. Porém, já foram encontradas espécies originárias de ilhas com mais de 16.000 km de distância do Brasil, como as Ilhas Crozet. Apesar de haver ocorrência ao longo de toda a costa brasileira, alguns autores sugerem que a presença desta espécie possa estar associada a alguns fenômenos oceanográficos, como o “El Niño” e o “La Niña”. Estima-se uma população atual de mais de 350.000 indivíduos, dos quais metade encontra-se nas Ilhas Gough (Oliveira, 2013).

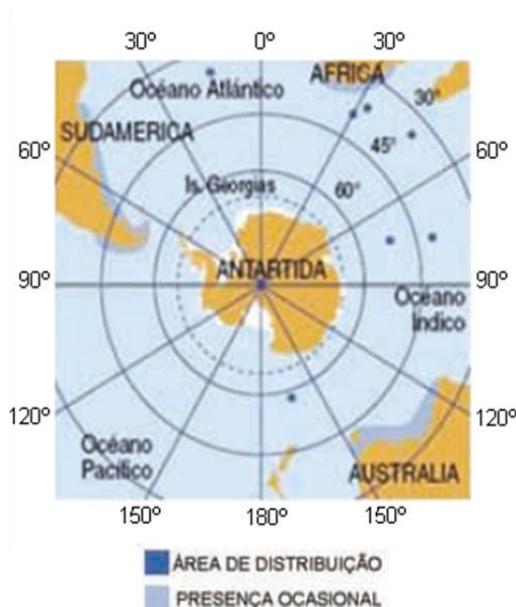


Figura 5. Distribuição geográfica do lobo-marinho-subantártico, *Arctocephalus tropicalis*. Fonte: Fonte: Bastida et al. (2007) apud Rocha-Campos et al. (2011).

2.2 O Gênero *Enterococcus*

Os enterococos compõem um grupo de micro-organismos altamente adaptados a ambientes complexos e capazes de sobreviver em condições adversas (Gilmore, 2014). Seu perfil taxonômico sofreu alterações relevantes nas últimas décadas, sendo atualmente consideradas 43 espécies distintas (Švec & Franz, 2014), com vários habitats, tropismos e características metabólicas e fenotípicas. Contudo, Euzéby (2014) já considera a existência de 53 espécies reconhecidas para o gênero. Entre os possíveis habitats, estão o solo, a água, as plantas e os hospedeiros animais, bem como os produtos de consumo humano, incluindo alimentos fermentados e produtos lácteos, conferindo ao gênero a característica da ubiquidade (Mundt, 1961; Mundt, 1963; Lebreton et al., 2014).

2.2.1 Taxonomia

Em 1899, o termo "entérocoque" foi utilizado pela primeira vez por Thiercelin, a fim de descrever o micro-organismo diplococo Gram-positivo de origem intestinal o qual observou. Durante muito tempo as tentativas de adequação taxonômica foram ignoradas e as divergências em relação à nomenclatura eram relativas tanto à distinção das espécies quanto ao estabelecimento do grupo dos enterococos. Desta forma, permaneceram como um subgrupo do gênero *Streptococcus*, e as diversas publicações surgidas ao longo das décadas de 1960, 1970 e 1980 levaram à inclusão de algumas cepas enterocócicas ao grupo dos estreptococos do Grupo D (Deibel, 1964; Facklam, 1972; Murray, 1990; Lebreton et al., 2014; Ševc & Franz, 2014; Euzéby, 2014).

O empenho em compreender estes micro-organismos, observado pela grande quantidade de literatura científica associada, é imprescindível para tornar conhecidas peculiaridades que servirão como ferramentas para isolamento, quantificação e interpretação de resultados (Deibel, 1964). Todavia, este gênero só foi formalmente aceito após 1984, quando Schleifer e Kilpper-Balz legitimaram a distinção entre espécies muito semelhantes, como *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, ao mostrar as evidências genéticas necessárias para confirmar as hipóteses que intencionavam desmembrar os enterococos dos estreptococos e outros grupos (Murray, 1990). Diante disso, cepas anteriormente consideradas como *Streptococcus* do Grupo D foram revisadas não somente com embasamento nas características bioquímicas, mas também em aspectos genéticos, e técnicas de hibridização

DNA-DNA e DNA-rRNA permitiram esclarecer o parentesco entre as estirpes e ampliar o esquema de classificação utilizando ácidos nucleicos (Murray, 1990; Švec & Franz, 2014).

Os enterococos compõem a família Enterococcaceae, juntamente com *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (Euzéby, 2014; Ludwig et al., 2009). A análise filogenética fundamentada na comparação do gene 16S rRNA mostra que o gênero *Enterococcus* apresenta maior similaridade com *Vagococcus*, *Tetragenococcus* e *Carnobacterium* do que com *Streptococcus* e *Lactococcus* (Facklam et al., 2002; Fisher & Phillips, 2009). A comparação entre sequências de DNA permanece sendo a metodologia padrão-ouro para o estabelecimento de espécies bacterianas e essa verificação foi realizada para a maioria dos enterococos. Entretanto, embora o sequenciamento do 16S rRNA tenha se tornado uma ferramenta adicional prática e confiável, eventualmente não é suficiente para distinguir algumas espécies, tais como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, que são 99,9% semelhantes por este critério. Consequentemente, melhorias metodológicas e técnicas moleculares complementares, como o DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD), foram desenvolvidas para auxiliar na correlação entre os dados (Facklam et al., 2002).

2.2.2 Descrição do gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* é composto por bactérias Gram-positivas, de formato ovoide, arranjadas em cadeias curtas, aos pares ou como células individuais. O conteúdo de pirimidinas (GC) no DNA varia de 37 a 45%, colocando os enterococos no ramo baixo GC de bactérias Gram-positivas (Filo

Firmicutes) (Gontang et al., 2007; Lebreton et al., 2014). Possuem crescimento ótimo entre 35 e 37 °C e toleram faixas de temperatura desde 10 °C até 45 °C. Crescem em meio contendo 6,5% de NaCl, suportam variações de pH (4.5-10.0), a maioria é capaz de sobreviver a 60 °C durante 30 minutos e hidrolizam a esculina na presença de sais biliares. Também hidrolizam a laucina- β -naftilamina produzindo leucina aminopeptidase (LAP). Muitas espécies hidrolisam a L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) produzindo pirrolidonil arilamidase (pirrolidonase), sendo esta uma característica também observada em estreptococos do grupo A (Murray, 1990; Manero & Blanch, 1999; Teixeira et al., 2011; Švec & Franz, 2014).

Os enterococos são anaeróbios facultativos, quimio-organotróficos e com metabolismo homofermentativo que resulta na produção de L-(+)-ácido láctico como produto final predominante da fermentação da glicose. Dessa forma, devido à capacidade de fermentar grandes quantidades de carboidratos a ácido láctico, são conhecidas como bactérias ácido lácticas (LAB). Estes microorganismos não possuem enzimas citocromo, assim como os estreptococos, o que lhes confere a característica de serem catalase-negativos, embora algumas cepas produzam pseudocatalase. A maioria das linhagens de enterococos produz ácido teicóico glicerol associado à parede celular, que é identificado como antígeno do grupo D, mas alguns também reagem com o grupo Q. Não é observada a formação de endósporos e nem a produção de gás (Fisher & Phillips, 2009; Teixeira et al., 2011; Švec & Franz, 2014). Algumas espécies apresentam motilidade, como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, e a produção de colônias pigmentadas pode ser observada em *E.*

casseliflavus, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* e *E. sulfureus* (Teixeira et al., 2011; Ševc & Franz, 2014).

Embora nenhum critério fenotípico isolado possa ser considerado como característico do gênero *Enterococcus*, o conjunto destes aspectos são valiosos quando se pretende identificá-los (Ke et al., 1999; Manero & Blanch, 1999). Isto não exclui, no entanto, as características atípicas rotineiramente encontradas em algumas cepas. A exemplo, alguns gêneros podem ser precocemente identificados por características compartilhadas, como *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Vagococcus*, que também demonstram a capacidade de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares e crescer em meios contendo 6,5% de NaCl. Diante disso, recomenda-se a associação de análises fenotípicas e genotípicas a fim de evitar estimativas errôneas e otimizar o tempo dedicado a testes que demandam maiores esforços (Teixeira et al., 2011; Ševc & Franz, 2014).

2.3 Ecologia de *Enterococcus* spp.

Sem dúvida, uma importante chave para a ampla distribuição do gênero *Enterococcus* na natureza e a capacidade de suportar uma variedade de condições ambientais decorre de estes micro-organismos realizarem trocas gênicas intra e interespecíficas, apresentarem fatores de virulência e a permanência de linhagens resistentes, além da capacidade de tolerar ambientes em condições muitas vezes consideradas adversas para outros organismos, como as variações de temperatura, salinidade e acidez (Eaton & Gasson, 2001; Mota et al., 2005; Fisher & Phillips, 2009).

Os enterococos são membros importantes dos tratos gastrointestinais de muitos animais, contribuindo para o equilíbrio destas comunidades, mas também são considerados patógenos oportunistas e, dependendo da relação parasita-hospedeiro, podem causar infecções severas. Considerando a distribuição ubíqua na natureza, destacam-se *E. faecalis* e *E. faecium* como as espécies mais abundantes em fezes humanas, podendo ainda ser encontrados em outros sítios anatômicos, como na cavidade oral, vesícula biliar, uretra e vagina. Embora constituam uma pequena parte do consórcio intestinal, representando menos de 1% da microbiota de adultos saudáveis, até meados da década de 1990, *E. faecalis* foi responsável por 90-95% dos isolados obtidos de infecções em humanos, enquanto *E. faecium* era raramente o agente causador. Apesar disso, estudos demonstram diferenças nas proporções entre as espécies de enterococos conforme variações sazonais, localização geográfica, dieta, idade e espécie do animal/hospedeiro (Lebreton et al., 2014; Murray, 1990; Tavares, 2000).

O considerável número de pesquisas envolvendo enterococos tem sido impulsionado por sua associação com infecções, entretanto, estes estudos representam somente uma pequena porcentagem da diversidade do gênero nos mais diversos ambientes (Figura 6). O entendimento da distribuição dos enterococos em outros animais não humanos e no ambiente como um todo, assim como a comparação destas espécies, contribui para o esclarecimento dos mecanismos de propagação destes micro-organismos (Lebreton et al., 2014).

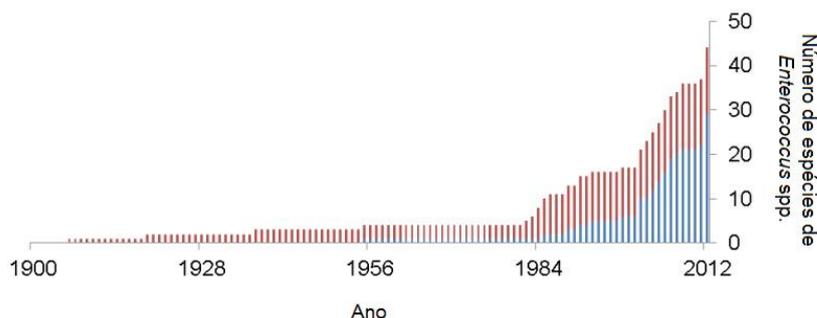


Figura 6. Acúmulo de espécies de *Enterococcus* spp. identificadas até o ano de 2012. As barras vermelhas mostram o número de espécies associadas com doenças humanas. Fonte: adaptado de Lebreton et al. (2014).

Em 1963, Mundt (1963) investigou enterococos em fezes de mamíferos, répteis e aves de ambientes selvagens. Posteriormente, em 1987, Devriese et al. (1987) avaliaram a distribuição e a prevalência das espécies de *Enterococcus* spp. no trato intestinal de diferentes animais, tais como aves domésticas, suínos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, cães e coelhos. No ano de 2010, Layton et al. (2010) compararam a composição de *Enterococcus* spp. de humanos saudáveis, cães, cavalos, gaivotas, focas e leões-marinhos que habitavam/frequentavam a região da Baía de São Francisco (Califórnia, EUA), e ainda de amostras de esgoto, a fim de avaliar indiretamente a qualidade da água das praias da costa da Califórnia e o potencial de espécies de enterococos como indicadores confiáveis.

A abundância deste gênero em amostras fecais, a facilidade de cultivo e a correlação com dados de saúde pública, levaram à utilização deste grupo como ferramenta para avaliar a qualidade da água doce e marinha em muitas partes do mundo. Contudo, sua ampla distribuição mesmo em ambientes com pouco ou nenhum contato com fezes tornam essa associação questionável (Manero & Blanch, 1999; Anderson et al., 2005; Layton et al.,

2010; Maraccini et al., 2012). Habitats como solo, sedimentos, areia, vegetação e ambientes aquáticos, com temperaturas variáveis, contrastam com o trato gastrointestinal de animais endotérmicos. Desta forma, o estudo da ecologia dos enterococos, relacionando sua ocorrência, persistência e sobrevivência em habitats não entéricos, e o uso destas bactérias como indicadoras, permitem inferir sobre diferentes características relacionadas à diversidade do gênero (Byappanahalli et al., 2012).

Castillo-Rojas et al. (2013) evidenciam a importância de investigar associações entre isolados de origem clínica e ambiental. Em seu estudo, linhagens clínicas e obtidas da água, incluindo uma amostra de água utilizada para irrigação, apresentaram espécies com diferentes perfis genotípicos e fenotípicos, até mesmo em relação aos níveis de resistência antimicrobiana.

Em alimentos, uma variedade de espécies de LAB tem despertado o interesse por proporcionar benefícios à saúde. Os enterococos podem ser utilizados benéficamente como probióticos (para melhorar o equilíbrio microbiano do intestino), nos processos de maturação e desenvolvimento de queijos (culturas *starter*) e também como atividade anti-*Listeria*, pela produção de bacteriocinas. Entretanto, também ocorrem como contaminantes naturais, podendo ser utilizados como indicadores de qualidade, principalmente em virtude de seu histórico como causadores de doenças, sugerindo uma avaliação cuidadosa antes de sua aplicação na indústria alimentícia (Eaton & Gasson, 2001; Giraffa, 2003; Johnston & Jaykus, 2004; Jiménez et al., 2013).

Prichula et al. (2013), ao investigarem a presença de enterococos resistentes a antimicrobianos em amostras de leite de búfala no Rio Grande do

Sul (Brasil), acrescentam que a presença deste grupo em alimentos deve receber atenção pela possibilidade de disseminação de genes de resistência na cadeia alimentar. Sob essa perspectiva, Jiménez et al. (2013) avaliaram a presença de enterococos, a suscetibilidade antimicrobiana e a presença de fatores de virulência em amostras de leite materno de mamíferos (suínos, felinos, caninos, ovinos e humanos), sugerindo que a presença de micro-organismos no leite materno seja uma via de transmissão de linhagens enterocócicas para o trato gastrointestinal de organismos juvenis.

A transmissão e disseminação de micro-organismos por vias aquáticas podem ter origem no escoamento de resíduos hospitalares, industriais e residenciais. As medidas tomadas nas estações de tratamento de água e esgoto, todavia, são incapazes de eliminar a carga microbiana, e a redução do número de bactérias não é suficiente para evitar a difusão por córregos, rios e oceanos (Nachtigall et al., 2013).

O ecossistema marinho tem sido alvo de estudos envolvendo *Enterococcus* spp. Em 2006, Moore et al. (2006) compararam métodos fenotípicos e genotípicos para identificação destes micro-organismos em amostras marinhas. Maraccini et al. (2012) investigaram a variação da composição de enterococos na água do mar de uma praia poluída na Califórnia (EUA). Byappanahalli et al. (2012), em revisão com ênfase em enterococos oriundos de ambientes aquáticos, solo e sedimentos, demonstram a influência de interferentes exógenos, como a salinidade e a disponibilidade de nutrientes, na seleção microbiana. Neste estudo, os autores destacam a influência de

fatores ambientais na determinação da sobrevivência ou expressão de genes, e também para o estabelecimento de relações intra e interespecíficas.

Apesar de grande parte dos estudos em águas marinhas serem motivados pela atenção dada aos enterococos como possíveis indicadores da qualidade de águas recreativas, ao se observar estirpes com diferentes perfis filogenéticos, pode-se inferir sobre o trânsito de algumas linhagens para animais marinhos. Bennani et al. (2012) pesquisaram a existência de *Enterococcus* spp. com resistência antimicrobiana em amostras de água do mar, sedimento e mariscos, obtidos de três pontos distintos da costa do Marrocos, a fim de relacionar com o uso abusivo destes compostos na medicina humana e veterinária, e a possível via de transmissão aquática. Ainda assim, embora alguns estudos incluam amostras de mamíferos marinhos, como o de Layton et al. (2010), com focas e leões-marinhos, nenhum deles utilizou, até o momento, amostras de lobos-marinhos e relacionou a existência de enterococos com características de resistência e patogenicidade.

2.4 Resistência Antimicrobiana

A preocupação incidente sobre os enterococos deve-se, não somente pelo papel como agentes de infecções hospitalares, mas também por sua resistência notável e crescente a antimicrobianos. Estes fatores se reforçam mutuamente uma vez que permitem a eles sobreviver em ambientes adversos, como o ambiente hospitalar, em que antimicrobianos são bastante utilizados, eliminando ou suprimindo bactérias sensíveis e proporcionando uma seletiva vantagem para organismos resistentes (Murray, 1990; Lebreton et al., 2014). Nesse sentido, ao se considerar inevitável a presença de micro-

organismos resistentes no ambiente hospitalar, sua disseminação para o ambiente extra-hospitalar merece atenção (Tavares, 2000).

Os enterococos são conhecidos por sua resistência múltipla a antimicrobianos, sendo este um fenômeno genético relacionado à existência de genes codificadores de mecanismos capazes de alterar a ação de substâncias antimicrobianas, podendo ser observada tanto a resistência intrínseca, quanto a resistência adquirida (Tavares, 2000). Os termos de resistência intrínseca, com genes localizados no cromossomo, são utilizados para indicar uma característica presente em todos ou na maioria das linhagens da espécie, conferido vantagem cumulativa para aquisição de mais genes codificadores de altos níveis de resistência. Já a resistência adquirida, geralmente determinada por elementos móveis como plasmídeos e transposons, é o resultado de uma mutação no DNA existente ou pela aquisição de novos fragmentos de DNA, que costumam ocorrer por conjugação, transformação ou transdução. Estas transferências genéticas ocorrem naturalmente, antecedendo o emprego dos antibióticos na terapêutica, e são frequentemente observados nos tratos gastrointestinais de seres humanos e outros animais (Murray, 1990; Mundy et al., 2000; Tavares, 2000; Mota et al., 2005; Ševc & Franz, 2014).

A elevação do número de linhagens resistentes exercendo pressão seletiva tem sido relacionada ao aumento observado no uso de antimicrobianos nas áreas clínica (humana e veterinária), industrial (ex. conservação de alimentos), comercial (ex. promotor de crescimento em animais) e experimental (Tavares, 2000; Turnidge, 2004; Lebreton et al., 2014). No ambiente, aparecem como importantes reservatórios de enterococos resistentes: estações de

tratamento de água, esgoto doméstico e hospitalar, sedimentos, águas superficiais, rios, lagos e oceanos (Caumo et al., 2010; Lebreton et al., 2014). Além desse aspecto, ao albergar e disseminar micro-organismos resistentes, esta constitui-se uma via de acesso pela qual genes externos são introduzidos, podendo alterar o equilíbrio da microbiota nativa. Logo, a investigação de micro-organismos da água pode ser uma ferramenta na compreensão dos mecanismos de resistência a antimicrobianos (Caumo et al., 2010).

Para tanto, dentre as características de resistência expressas por enterococos, serão discutidas a seguir aquelas relacionadas aos mecanismos de ação e à resistência das classes de antimicrobianos avaliados no estudo.

2.4.1 β -lactâmicos

A resistência relativa dos enterococos a β -lactâmicos é uma característica típica do gênero. Mesmo cepas isoladas de populações primitivas, que tiveram pouca ou nenhuma exposição a antibióticos industriais, já apresentavam esta propriedade. A suscetibilidade aos β -lactâmicos é influenciada, principalmente, pela presença de uma proteína de ligação de penicilinas (PBP) na membrana plasmática bacteriana, de modo a inibir a síntese da parede celular. De estrutura semelhante, cefalosporinas e carbapenêmicos apresentam ação análoga, porém atividade ainda menor frente a enterococos, sendo a ampicilina a mais efetiva entre as penicilinas (Murray, 1990; Shepard & Gilmore, 2002). O elevado nível de resistência é adquirido pela produção de β -lactamases ou modificações estruturais nas PBP's, tornando-as menos suscetíveis à inibição pelo antimicrobiano.

2.4.2 Aminoglicosídeos

Estreptomicina e gentamicina são exemplos de antimicrobianos de amplo espectro desta classe. O efeito deste antimicrobiano deve-se à interferência do composto na síntese de proteínas pela ligação à porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S, ocasionando a morte celular. O nível de resistência varia entre os diferentes aminoglicosídeos e está associado à baixa permeabilidade da parede celular a estas moléculas, reduzindo sua entrada na célula bacteriana. Como todas as espécies de enterococos são resistentes intrinsecamente a baixos níveis a aminoglicosídeos, então o sinergismo ocasionado pela adição de um aminoglicosídeo com um composto de ação na estrutura da parede celular bacteriana, como β -lactâmicos e glicopeptídeos, resultaria no efeito esperado pelo medicamento, uma vez que a ação sinérgica das drogas levaria à penetração do aminoglicosídeo pela parede celular danificada (Tavares, 2000).

No entanto, estratégias adotadas pelos micro-organismos levaram ao surgimento de estirpes com resistência a altos níveis aos aminoglicosídeos e mesmo ao sinergismo. Por conseguinte, a aquisição de genes que codificam enzimas como fosfotransferases, acetiltransferases ou nucleotidiltransferases, promovendo modificações na estrutura do antimicrobiano, elevam os níveis de resistência (Murray, 1990; Murray, 1998; Shepard & Gilmore, 2002).

2.4.3 Glicopeptídeos

Como exemplo de glicopeptídeos tem-se a vancomicina e a teicoplanina. O glicopeptídeo atua na inibição do crescimento bacteriano por

interferência na biossíntese da parede celular, proveniente da ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina. Algumas espécies, como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, possuem como característica intrínseca a resistência em baixos níveis à vancomicina e a suscetibilidade à teicoplanina. A resistência em baixos níveis à vancomicina é causada por modificações na estrutura da parede celular, que decorre da associação de um aminoácido diferente no lugar do resíduo de alanina (alvo D-alanil-D-alanina por D-alanil-D-lactato ou por D-alanil-D-serina), onde ocorreria a ligação do fármaco, ocasionando perda da integridade da parede, seguida de morte celular. Observa-se que os enterococos com elevada resistência utilizam precursores do peptidoglicano com radical modificado, codificados geneticamente, e impedindo o reconhecimento pela vancomicina e outros antibióticos do grupo (Tavares, 2000).

Nove fenótipos de resistência a glicopeptídeos já foram descritos em enterococos, sendo cada tipo associado a diferentes elementos gênicos (Kristich et al., 2014). Destacam-se os fenótipos VanA (induzível, localizado em transposons situados em plasmídeos que eventualmente podem passar ao cromossomo; conferem resistência em altos níveis à vancomicina e à teicoplanina) e VanB (induzível, localizado no cromossomo ou em transposons cromossômicos, responsável por níveis de resistência de moderado a alto à vancomicina), considerados de alta relevância clínica e frequentemente associados a *E. faecalis* e *E. faecium*. O fenótipo VanC (resistência em baixos níveis à vancomicina), relacionado à resistência intrínseca em *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, é habitualmente encontrado em enterococos de aves; e os

fenótipos expressos pelos genes *vanD*, *vanE*, *vanG* e *vanL*, que ocorrem com menor frequência em enterococos. Além destes, um sistema de tradução de sinal composto pelos genes *vanR* (regulador de resposta) e *vanS* (sensor de quinase), controlam a expressão da resistência à vancomicina (Murray, 1990; Tavares, 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Fisher & Phillips, 2009; Teixeira et al., 2011; Kristich et al., 2014).

2.4.4 Macrolídeos

Eritromicina, claritromicina e azitromicina fazem parte deste grupo. A ação bacteriostática destes antimicrobianos ocorre pela inibição da síntese de proteínas, em decorrência da ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S do micro-organismo. A resistência é proveniente da dificuldade do antimicrobiano em se ligar ao ribossomo, causada pela alteração (metilação) do sítio de ligação por enzimas que modificam o resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do rRNA. Plasmídeos e transposons de resistência à eritromicina são comumente encontrados em enterococos e ocorrem como parte do fenótipo de resistência a macrolídeos-lincosamida-estreptogramina B. Além de resistência à eritromicina, este determinante também confere resistência em altos níveis à clindamicina (Classe: Lincosamina). Existem diferentes determinantes de resistência à eritromicina, mas um especialmente comum, o *ermB*, é carregado por *Tn917*, difundido em diferentes espécies de estreptococos e enterococos isolados de humanos e animais. Embora o mais frequente seja mediado pelo gene *erm(B)*, existem outros mecanismos de resistência reconhecidos, como *erm(A)* e *mef(A)* (Murray, 1990; Diarra et al., 2010).

2.4.5 Quinolonas

Existem mais de vinte representantes integrando esta classe, entre eles, ciprofloxacina e norfloxacina. Com o acréscimo de um átomo de Flúor na estrutura do composto originando as fluoroquinolonas, houve um aumento do espectro de ação para bacilos Gram-negativos e alguns cocos Gram-positivos. Porém, a ação sobre *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e anaeróbios é considerada de fraca à moderada, sendo comum a resistência a estes antimicrobianos. O mecanismo de ação consiste na penetração pelo citoplasma celular, inibição da enzima alvo no DNA bacteriano e indução de reação com efeitos nocivos sobre a estrutura celular e bioquímica da bactéria. O alvo destes compostos são as enzimas DNA girase ou topoisomerase II, no caso das bactérias Gram-negativas, e a topoisomerase IV para as bactérias Gram-positivas (Jackson et al., 1998; Gama, 2008).

A resistência às quinolonas decorre principalmente de: a) mutações pontuais nas sequências de DNA das enzimas; b) alteração da permeabilidade da membrana celular; ou ainda por c) bomba de efluxo para retirada da droga do interior da célula, impedindo, assim, a ação da substância (Jackson et al., 1998; Nordmann & Poirel, 2005).

2.4.6 Cloranfenicol

A ação bacteriostática deste antimicrobiano provém da inibição da síntese proteica, pela ligação à subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a ação da enzima peptidiltransferase. Os enterococos apresentam resistência a este composto, comumente mediada pelo gene *cat*, presente no cromossomo

ou em plasmídeos, que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase, alterando a estrutura química da substância de forma a perder a capacidade de ligação ao ribossomo (Murray, 1990).

2.4.7 Nitrofurantoína

Compostos nitrofurânicos com atividade antibacteriana têm sido utilizados em medicina veterinária e humana por apresentarem amplo espectro de ação e baixa capacidade de seleção de bactérias resistentes. Apesar disso, em virtude da alta toxicidade da maioria desses compostos, somente alguns derivados são utilizados na prática médica, como a nitrofurantoína e a nifuroxazida, que apresentam toxicidade tolerável (Masunari & Tavares, 2006). O mecanismo de ação deve-se à inibição de sistemas enzimáticos bacterianos, como a acetilcoenzima A, ou pela interrupção da síntese da parede celular.

2.4.8 Tetraciclina

A ação bacteriostática ocorre pela ligação do antimicrobiano, de maneira reversível, à subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador (tRNA) ao RNA mensageiro (mRNA), e impedindo a síntese proteica. A resistência à tetraciclina, presente em enterococos, pode ocorrer por determinação cromossomal ou mediada por plasmídeos e transposons. Entre os mecanismos de resistência observados, destacam-se o efluxo da droga através da membrana, mediada por genes como *tet(K)* e *tet(L)*, a alteração do ribossomo pelos genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)*, que dificultam a ligação do composto, e a produção de enzimas que inativam a tetraciclina (Bentorcha et al., 1991; Frazzon et al., 2010).

Entre os genes já identificados, destaca-se o *tet(M)*, tipicamente cromossômico e geralmente carregado pelo transposon *Tn916* ou transposons conjugativos. Este gene já foi relatado em outros gêneros bacterianos, como *Mycoplasma* spp., *Campylobacter* spp. e *Clostridium* spp., e promove a resistência através da proteção dos ribossomos por inibição da tetraciclina. Diferentemente, o gene *tet(L)*, cromossomal ou plasmidial (pAM α 1), articula efluxo ativo de tetraciclina a partir de células (Murray, 1990; Murray, 1998).

2.5 Fatores de Virulência

A aquisição de fatores de virulência, assim como as características intrínsecas de resistência, permite que bactérias consigam sobreviver e se reproduzir mesmo em ambientes competitivos (Mundy et al., 2000). Segundo Mannu et al. (2003), fatores de virulência são elementos que propiciam a um micro-organismo colonizar, invadir, contornar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro, aumentando as chances de desencadear quadros infecciosos. Eaton & Gasson (2001) destacam, entre as características que conferem virulência: aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos. Isto posto, pode-se dizer que desempenham um papel na promoção da persistência de enterococos no ambiente e, conseqüentemente, contribuem para sua disseminação (Camargo et al., 2008).

A facilidade em realizar trocas gênicas reflete no surgimento de linhagens com características aprimoradas de virulência. Estas trocas envolvem uma diversidade de elementos genéticos, tais como ilhas de patogenicidade, conversão de fagos para a produção de toxina e aquisição de

fatores de virulência por plasmídeos e/ou transposons. Entre os enterococos, a maior capacidade em provocar doença parece ter relação com características adquiridas por algumas cepas, as quais têm permeado entre as espécies, como determinantes de resistência antimicrobiana, toxina citolítica, gelatinase, substância de agregação, proteínas de superfície, entre outros (Mundy et al., 2000).

Não obstante, as diferenças entre um enterococos patogênico e um aparentemente seguro, e seu potencial em adquirir fatores de virulência, ainda não foram totalmente investigados (Eaton & Gasson, 2001). Apesar de estes fatores estarem preferencialmente associados com estirpes de *E. faecalis*, tem sido averiguada a presença em outras espécies, o que sugere ser um traço comum no gênero (Semedo et al., 2003; Willems et al., 2001).

2.5.1 Adesinas

Em ambientes complexos, como o trato gastrointestinal, a fixação ao tecido hospedeiro é fundamental no estabelecimento de uma comunidade bacteriana. Sistemas envolvendo adesinas foram descritos em vários agentes patogênicos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, entre outros, demonstrando papéis na fagocitose, incitando ou reduzindo respostas inflamatórias ou atuando como toxinas (Jett et al., 1994).

Como uma das primeiras etapas de um processo infeccioso, a ligação a receptores específicos da superfície da mucosa permite que ocorra a colonização por micro-organismos como os *Enterococcus* spp.. Esta ligação,

mediada por adesinas, facilita a permanência neste habitat e a não eliminação pelo fluxo intestinal normal (Jett et al., 1994).

2.5.1.1 Substância de agregação

A substância de agregação (Agg) é uma glicoproteína considerada como fator de colonização induzida por feromônios e codificada por plasmídeos. Esta proteína de superfície promove a formação de agregados durante a conjugação bacteriana, facilitando a transferência de plasmídeos, a adesão à célula eucariótica e elevando a capacidade de transferir a resistência antimicrobiana (Clewell, 1993; Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004; Fisher & Phillips, 2009; Ševc & Franz, 2014). Existem ainda indícios de que possua atividade de superantígeno ao se relacionar com os ácidos teicoicos da parede celular, influenciando a fagocitose e o destino subsequente do organismo (Mundy et al., 2000).

Em *E. faecalis*, já foram descritos quatro plasmídeos responsáveis pela codificação da proteína Agg: pAD1, pCF10, pD1 e pAM373, sendo que, os genes relacionados a estes plasmídeos são, respectivamente: *asa1*, *asc10*, *asa373* e *ash701* (Camargo et al., 2008). Golińska et al. (2013) encontraram uma ocorrência significativa do gene *asa1* em cepas de enterococos isoladas de pacientes com infecções intestinais. Este gene é responsável pela agregação de bactérias na superfície do tecido do hospedeiro (particularmente enterócitos, granulócitos, neutrófilos e células epiteliais do trato urinário), permitindo a conjugação entre as bactérias devido ao aumento da hidrofobicidade da superfície da parede celular (Golińska et al., 2013).

O aumento da hidrofobicidade também pode induzir à localização de colesterol para fagossomos e prevenir ou retardar a fusão com vesículas lisossomais (Fisher & Phillips, 2009), além de melhorar a capacidade do organismo para se associar com células epiteliais intestinais (Mundy et al., 2000). Conseqüentemente, cepas que possuem o gene *asa1*, ao desenvolverem grandes agregações de células podem, simultaneamente, aumentar a população bacteriana. Recentemente, foi demonstrado que a presença do gene estava associada a um importante mecanismo patológico por favorecer uma adesão forte da bactéria às superfícies da mucosa intestinal, além de promover a formação de biofilmes, como uma forma de proteção contra fatores ambientais desfavoráveis (ex. aumento do fluxo intestinal causado pela diarreia) (Golińska et al., 2013).

2.5.1.2 Adesina de colágeno

Em mamíferos, há 20 tipos de colágenos geneticamente diferentes, alguns dos quais apresentam uma distribuição específica quanto ao tecido. Como por exemplo, o colágeno tipo IV é encontrado exclusivamente em membranas basais, enquanto o colágeno tipo I apresenta uma distribuição relativamente ampla (Nallapareddy et al., 2000). A adesina de colágeno, tipicamente presente em linhagens de *E. faecalis*, é uma proteína categorizada entre os componentes da superfície microbiana como da família de moléculas de matriz adesiva (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* - MSCRAMM) (Shepard & Gilmore, 2002; Koch et al., 2004; Fisher & Phillips, 2009).

O gene *ace* é o responsável por codificar esta proteína de superfície que reconhece e estabelece a ligação a proteínas presentes em células do hospedeiro como a laminina e o colágeno tipo I e tipo IV. Dessa forma, a expressão do gene parece contribuir para a patogênese de processos infecciosos ao facilitar a ligação com a célula-alvo (Shepard & Gilmore, 2002).

2.5.2 Citolisina

A citolisina é uma substância proteica com atividade hemolítica em sangue humano, de coelho e de cavalo, mas não em sangue de carneiro. Embora possua atividade antimicrobiana (bacteriocina) contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, a citolisina produzida por enterococos pode ser letal para muitas células procarióticas e eucarióticas (Jett et al., 1994; Coburn & Gilmore, 2003; Golińska et al., 2013).

Esta proteína está associada a um aumento do risco de morte súbita em casos de bacteremia nosocomial, sendo recorrente em cerca de 60% dos *E. faecalis* isolados de investigações de surtos (Mundy et al., 2000). Apesar de muitos estudos destacarem a atividade citolítica em infecções causadas por *E. faecalis*, esta característica não é exclusiva de isolados clínicos e tampouco está associada apenas a esta espécie. Semedo et al. (2003) investigaram genes relacionados à atividade hemolítica de linhagens de enterococos obtidos de amostras clínicas humanas e veterinárias, com origem infecciosa, mas também de alimentos como queijo e leite.

Classificada como um Lantibiótico do tipo A (Coburn et al., 1999), a citolisina é codificada por um operon composto de oito genes: *cyL_L*, *cyL_S*, *cyI_A*,

cyB, *cyM*, *cyI*, *cyR1* e *cyR2*. Estes genes são tipicamente carregados pelo plasmídeo pAD1, responsivo a feromônios, ou integrados ao cromossomo bacteriano (Jett et al., 1994; Coburn et al., 1999; Koch et al., 2004).

O modelo para a expressão, maturação, secreção e ativação da citolisina inclui duas subunidades estruturais codificadas pelos genes *cyL_L* e *cyL_S* (Semedo et al., 2003). A regulação da expressão da citolisina é feita por um mecanismo *quorum sensing* (Fisher & Phillips, 2009), sendo dependente da presença de células-alvo. Na ausência destas, *cyL_S* e *cyL_L* formam um complexo que bloqueia o mecanismo de autoindução do *quorum sensing*. Porém, quando as células-alvo estão presentes, *cyL_L* liga-se ao alvo permitindo que *cyL_S* acumule, levando à indução da expressão de altos níveis de citolisina (Coburn et al., 1999). Estas subunidades são modificadas no interior da célula, pós-tradução, pelo produto do gene *cyM*, e transportadas para fora da célula por intermédio do *cyB*. Após a externalização, componentes precursores da citolisina são ativados pelo produto do gene *cyA*. Um sexto gene (*cyI*) codifica uma proteína responsável pela imunidade de bactérias produtoras de citolisina à própria citolisina (Coburn et al., 1999). Todos os seis genes estruturais são agrupados (*cyL_L*, *cyL_S*, *cyM*, *cyB*, *cyA*, e *cyI*) e dispostos na mesma orientação. No entanto, a regulação da expressão da citolisina é dependente dos produtos de dois outros genes, o *cyR₁* e o *cyR₂*, considerados genes regulatórios, dispostos na orientação oposta aos outros seis, e implicando na repressão da transcrição de genes da citolisina (Semedo et al., 2003; Coburn & Gilmore, 2003).

Apesar de a síntese de citolisina ser um processo complexo que envolve modificações pós-traducionais, secreção, lise proteica e recrutamento de enzimas para cada etapa, o estudo dos mecanismos envolvidos na atividade hemolítica da citolisina têm apontado sua influência na patogênese das infecções bacterianas. Em pacientes com doenças intestinais, o gene *cylA* mostrou-se relacionado ao aumento populacional de outras bactérias patogênicas, como *E. coli*. Através da inibição dos leucócitos e lise dos eritrócitos do hospedeiro, com consequente liberação de ferro e nutrientes, a quantidade de recurso disponível acaba por influenciar outras populações de micro-organismos e pode ser considerada uma característica vantajosa às células citolíticas em relação a isolados não produtores da enzima (Coburn & Gilmore, 2003; Golińska et al., 2013).

Não obstante, a maioria das estirpes que contêm os genes da citolisina possui também o gene do fator de agregação, estando estes associados aos plasmídeos que respondem aos feromônios, podendo ambos atuar conjuntamente (Mundy et al., 2000).

2.5.3 Gelatinase

A gelatinase caracteriza-se por ser uma protease, classificada como enzima metaloendopeptidase extracelular, capaz de hidrolisar substratos como a gelatina, o colágeno, a caseína, a hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (Jett et al., 1994; Eaton & Gasson, 2001), bem como feromônios e peptídeos inibidores envolvidos na transferência do plasmídeo conjugativo de *E. faecalis* (Camargo et al., 2008). Sabe-se ainda que esta enzima é codificada pelo gene *gelE*, localizado no cromossomo, e que um

locus com três genes (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*) é responsável por sua regulação (Qin et al., 2000; Fisher & Phillips, 2009).

Fisher & Phillips (2009) atribuíram como principal papel da gelatinase, na patogênese causada por enterococos, o fornecimento de nutrientes para as bactérias por degradação do tecido hospedeiro, embora também tenha sido descrito seu papel na formação de biofilme (Camargo et al., 2008). Golińska et al. (2013) associaram a atividade da gelatinase como uma das principais causas das alterações patológicas no hospedeiro com infecção intestinal. Estas alterações decorrem do enfraquecimento das ligações proteicas entre as células epiteliais que revestem a parede intestinal do hospedeiro, o que causa o rompimento da barreira na mucosa. Eaton & Gasson (2001) encontraram isolados de enterococos carregando o gene *geIE*, mas que não apresentaram o fenótipo correspondente. Isso demonstra que outros fatores podem estar relacionados com a regulação da expressão gênica, como por exemplo, determinantes ambientais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram analisadas dez amostras de fezes de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, pela equipe do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) – vinculado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – e encaminhados ao centro de reabilitação, localizado no município de Imbé/RS, para estudos posteriores. As coletas foram realizadas durante os meses de julho e agosto de 2012, durante registros de chamada ou monitoramentos. Os registros de chamada são realizados quando algum animal é encontrado na beira da praia e pode ser feita pela população em geral. Já os monitoramentos consistem no acompanhamento periódico das áreas que compreendem a extensão de Imbé a Torres e de Tramandaí a Quintão, sendo que a cada semana uma das áreas é monitorada.

As coletas obedeceram a um protocolo (Apêndice 1) que estabelecia os critérios e cuidados que foram adotados antes, durante e após a coleta das fezes, a fim de preservar a integridade do material. Todos os animais encontrados estavam mortos sob grau de decomposição *Code 2* ou *Code 3*, de

acordo com critérios estabelecidos por Geraci (2005) para análises microbiológicas e moleculares. Este parâmetro consiste de um total de 5 estágios, em que o primeiro (*Code 1*) refere-se ao animal ainda vivo; no segundo estágio (*Code 2*), o animal morto apresenta-se ainda fresco, com a carcaça intacta e com boa aparência corporal; e no estágio *Code 3* o animal encontra-se com a carcaça aparentemente intacta mas já apresenta sinais de início de decomposição, como odor característico, membranas mucosas secas, olhos afundados ou ausentes, entre outros. Nenhum dos lobos-marinhos utilizados no estudo recebeu qualquer tipo de tratamento antes da coleta do material fecal.

Uma alíquota de aproximadamente 40 mL das fezes de cada lobo-marinho foi acondicionada em recipiente plástico do tipo Falcon e mantida sob refrigeração para transporte ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. As amostras permaneceram acondicionadas em -70 °C até o processamento para análises subsequentes.

3.2 Processamento das amostras e isolamento de *Enterococcus* spp.

As amostras de fezes dos lobos-marinhos foram processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do ICBS – UFRGS.

Baseado na metodologia utilizada por Teixeira et al. (2011) para seleção e isolamento de enterococos, um grama (1 g) de cada amostra foi inoculada em 10 mL de solução salina 0,85% e mantida sob agitação (100 rpm)

a 37 °C durante 24 h, a fim de ressuspender a amostra em meio líquido. Então, 1 mL foi transferido para 9 mL de meio caldo Azida Dextrose (*Azide Dextrose Broth* – Himedia®, India) seletivo para enterococos, permanecendo sob agitação (100 rpm) a 37 °C durante 24 h. Após, foram feitas diluições seriadas em solução salina 0,85% (diluições 10^{-1} a 10^{-6}), em que 100 µL de cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo ágar Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI, Himedia®, India) suplementado com 6,5% de Cloreto de Sódio (NaCl - Nuclear®) e incubados novamente a 37 °C durante 24 h.

No dia seguinte, vinte e quatro (24) unidades formadoras de colônia (UFC) isoladas de cada amostra foram escolhidas aleatoriamente, as quais cresceram nos meios contendo as diluições, conforme metodologia recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 1998). Cada uma das 24 colônias selecionadas foi analisada fenotipicamente através da coloração de Gram, hidrólise da esculina na presença de sais biliares, capacidade de crescimento a 45 °C e quanto à produção de catalase, sendo assim categorizada como pertencente ou não ao gênero *Enterococcus* spp. (Facklam et al., 2002). Destas, ficou pré-estabelecido que vinte UFC prosseguiriam para as etapas seguintes.

3.2.1 Teste da hidrólise da esculina na presença de sais biliares

Este teste tem por finalidade diferenciar enterococos e estreptococos do grupo D de outros estreptococos. Cada isolado foi inoculado em meio ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar* – Himedia®, India) e mantido a 37 °C durante

24 h. A presença de bile no meio inibe o crescimento de organismos Gram-positivos e estreptococos, à exceção dos enterococos e estreptococos do grupo D. Dessa forma, a esculina presente no meio é hidrolizada, formando esculetina e dextrose. A esculetina reage com sais de ferro presentes no meio, tornando-o enegrecido. Assim, a prova positiva é evidenciada pela coloração escura no meio, indicativa da presença de hidrólise (Chuard & Reller, 1998; Braga et al., 2008).

3.2.2 Teste da catalase

Para detectar a presença da enzima catalase, uma porção do crescimento bacteriano foi transferida para uma lâmina de vidro, sendo adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (Lifar®). Quando o micro-organismo possui a enzima, o teste da catalase demonstra a decomposição do peróxido de hidrogênio, com formação de água e oxigênio molecular, observado através da presença de bolhas. No caso do gênero *Enterococcus* não há a formação de bolhas, sendo, portanto, catalase negativo.

3.2.3 Armazenamento dos isolados bacterianos

As colônias foram preservadas em solução de 10% (p/v) de leite desnatado Molico® (Nestlé) acrescido de 10% (v/v) de glicerol (LabSynth®), congeladas a -20 °C para análises moleculares posteriores e a fim de evitar que características importantes se perdessem com o tempo de manuseio das colônias, como plasmídeos de resistência, por exemplo.

Antes da realização dos ensaios, os isolados foram submetidos a crescimento em ágar BHI (Himedia®, India) a 37 °C durante 24 h.

3.3 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi realizada por método físico-químico (Donato, 2007). Uma colônia previamente isolada em ágar BHI (Himedia®, India) foi reinoculada em 5 mL de caldo BHI a 37 °C por 24 h. Após, 1 mL dessa cultura foi transferida para um microtubo, o qual foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 40 µL da solução de lise composta por 5% de NaOH 1M, 2,5% de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 92,5% de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). O *pellet* ressuspendido na solução de lise permaneceu à temperatura de 100 °C durante 15 minutos e, posteriormente, foi diluído em 460 µL de tampão TE 1X, homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após essa centrifugação, o sobrenadante formado contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20 °C. O *pellet* foi descartado. A confirmação da extração foi realizada por corrida eletroforética com gel de agarose 1,0% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

3.4 Confirmação do gênero *Enterococcus* por PCR

A confirmação do gênero foi realizada por caracterização molecular utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *tuf* (Tabela 2).

As reações da PCR foram adaptadas de Ke et al. (1999) e otimizadas em 25 µL de volume total, contendo: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1U de

Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 3 min a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C e 1 min a 72 °C; e 7 min a 72 °C. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* SS1274 foram utilizadas como controles positivos durante as reações. O amplicon esperado com tamanho de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

3.5 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. por PCR Multiplex

Os isolados foram testados por Reação em Cadeia da Polimerase do tipo Multiplex para identificar quatro espécies de enterococos que costumam ser detectadas em amostras de fezes: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. Os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos gerados e referências consultadas estão listados na Tabela 2.

As reações da PCR foram otimizadas em 10 µL de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT® – Integrated DNA Technologies), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 50 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume

(MilliQPlus, Millipore®) (Nachtigall et al., 2013). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C. Cepas ATCC e isolados de referência cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), foram adotados como controles positivos durante as reações: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274, *E. casseliflavus* PAD 71 e *E. gallinarum* ATCC RS-64. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (*tuf*) e espécie-específicos (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*) e tamanhos dos fragmentos gerados.

Oligonucleotídeos Iniciadores ¹	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
Tuf-F	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Ke et al. (1999)
Tuf-R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
EFm_F	TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Cheng et al. (1997)
EFm_R	TTGAGGCAGACCAGATTGACG		
ddl_F	CACCTGAAGAAACAGGC	475	Depardieu et al. (2004)
ddl_R	ATGGCTACTTCAATTTACAG		
CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288	Jackson et al. (2004)
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG		
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTTCG	173	Jackson et al. (2004)
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG		

¹*Enterococcus faecium* (EFm_F e EFm_R), *Enterococcus faecalis* (ddl_F e ddl_R), *Enterococcus casseliflavus* (CA1 e CA2) e *Enterococcus gallinarum* (GA1 e GA2).

3.6 Testes bioquímicos

Os isolados que não puderam ser identificados pela técnica de PCR Multiplex foram submetidos a provas bioquímicas convencionais. A metodologia utilizada seguiu os métodos sugeridos por Teixeira et al. (2011). Foi avaliada a fermentação de açúcares (arabinose, manitol, metil- α -D-

glicopiranosídeo (MGP), rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose), a hidrólise da arginina, a produção de pigmento e a utilização do piruvato. Para todas as provas de identificação bioquímica foram utilizadas como amostras de referência as cepas padrão *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* SS1274.

3.6.1 Teste de fermentação de açúcares

A produção de ácidos a partir da utilização de açúcares como fonte de carbono pode ser observada pela alteração da coloração do meio de cultura em virtude da alteração do pH do meio. A determinação da capacidade de utilizar açúcares foi realizada a partir da inoculação do micro-organismo cultivado em solução salina 0,85% a 37 °C durante 24 h. Deste pré-inóculo, 100 µL ajustados à escala padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL) foram acrescentados aos tubos contendo os meios testes. Cada tubo continha o meio teste composto por água peptonada, 0,1% de solução alcoólica do indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt®) e 1% do carboidrato a ser testado: L-arabinose (Sigma-Aldrich®), Manitol (Nuclear®), MGP (Sigma-Aldrich®), D-rafinose (Vetec®), Sacarose (Vetec®), D-sorbitol (Difco® Laboratories) ou L-sorbose (Sigma-Aldrich®). O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido na faixa de 7,2 – 7,6. As leituras foram feitas após 24 h e até sete dias após a incubação a 35 ± 2 °C. Foi considerado positivo o tubo em que se observou a presença de crescimento e a alteração da coloração do meio de púrpura para amarela.

3.6.2 Hidrólise da arginina

Para o teste da hidrólise da arginina foi utilizado o meio *Decarboxylase Base Moeller* (peptona de carne 0,5%, extrato de levedura 3% e glicose 1%) acrescido de 1% de L-arginina (Sigma-Aldrich®) e indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt®). O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido na faixa de 7,2 – 7,6. Após a adição de 100 µL de suspensão bacteriana ajustada à escala padrão 0,5 de McFarland, foi gotejada uma camada de aproximadamente 10 mm de óleo mineral estéril (Proquímios®) e os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C, sendo realizada leitura após 24 h e até sete dias após a incubação. Neste caso, os tubos controles não são acrescidos do açúcar e o resultado positivo é verificado pela manutenção da coloração púrpura, devido à alcalinização do meio, em decorrência da hidrólise do substrato.

3.6.3 Produção de pigmento

A produção de pigmento foi observada em culturas obtidas em ágar BHI (Himedia®, Índia) após 24 h de incubação a 35 ± 2 °C. Com o auxílio de um *swab*, considerou-se positivo o isolado que apresentou coloração amarela quando a colônia foi recolhida.

3.6.4 Utilização do piruvato

A utilização do piruvato de sódio (Nuclear®) a 1% foi verificada em meio contendo 1% de triptona (BD®), 0,5% de extrato de levedura (Himedia®, Índia), 0,5% de K₂HPO₄ (LabSynth®), 0,5% de NaCl (Dinâmica® Química Contemporânea Ltda.) e 0,01% do indicador de pH azul de bromotimol. O pH da solução foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo

mantido a 6,8. Após inoculação de 100 µL da solução bacteriana, incubou-se a 35 ± 2 °C e realizou-se as leituras após 24 h e até sete dias após a incubação inicial. Foram considerados positivos para a utilização deste açúcar os meios que mudaram a coloração para a cor amarela.

3.7 Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA

Os isolados que não puderam ser identificados por PCR Multiplex foram submetidos aos testes bioquímicos convencionais, sendo agrupados em perfis, de acordo com os resultados do bioquimismo. Pelo menos um representante de cada grupo/perfil teve o fragmento de DNA genômico amplificado na região do gene 16 rRNA por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F-C27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e R-530 (5'-CCG CGG CTG CTG GCA CGT A-3') (Gontang et al., 2007).

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 300 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (GBT® Oligos), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 45 segundos a 72 °C; e 5 min a 72 °C (Moura, 2011). A cepa *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo durante as reações. O amplicon esperado com tamanho de 530 pb foi

analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

Os produtos foram sequenciados em equipamento modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP6. Para a marcação, foi utilizado o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8 Testes de suscetibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade antimicrobiana dos isolados foi testada pelo método de disco-difusão conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2013). Os isolados foram cultivados em ágar BHI (Himedia®, Índia) por 24 h a 37 °C. Os inóculos foram preparados pela suspensão das colônias em 5 mL de solução salina 0,85% estéril e a turvação foi ajustada para o padrão da escala 0,5 McFarland. Cada suspensão contendo o inóculo foi semeada em placa contendo ágar Müller-Hinton (*Müller-Hinton Agar*, Acumedia®, Neogen, Michigan) com o auxílio de *swab*. Após, os discos contendo os antimicrobianos foram depositados sobre a placa com o auxílio de pinça bacteriológica previamente esterilizada. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h. Após esse período, o diâmetro das zonas de inibição ao redor dos discos contendo os agentes antimicrobianos foi medido com o auxílio de um paquímetro e interpretado de acordo com as normas do CLSI (2013).

Os antimicrobianos testados foram (concentração expressa em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): ampicilina (10), vancomicina (30), eritromicina (15), tetraciclina (30),

ciprofloxacina (5), norfloxacina (10), nitrofurantoína (300), cloranfenicol (30), gentamicina (120) e estreptomicina (300) (Sensifar®, Cefar Diagnóstica Ltda).

3.9 Verificação da presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)* relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina

A verificação dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)* foi realizada somente nos isolados que apresentaram algum tipo de resistência à tetraciclina ou à eritromicina. A análise da presença/ausência dos genes foi baseada na metodologia adotada por Frazzon et al. (2010), através da técnica de PCR. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
tet(L)_F tet(L)_R	ACT CGT AAT GGT TGT AGT TGC TGT AAC TCC GAT GTT TAA CAC G	625	Frazzon et al. (2010)
tet(M)_F tet(M)_R	GTT AAA TAG TGT GTC TTG GAG CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA	657	Aarestrup et al. (2000)
erm(B) 1 erm(B) 2	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	639	Sutcliffe et al. (1996)

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*tet(L)* - IDT®; *tet(M)* - Bioneer®; *erm(B)* - Bioneer®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições:

- *tet(L)*: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C e 1 min a 72 °C; e 10 min a 72 °C (Frazzon et al., 2010).

- *tet(M)*: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C e 1 min a 72 °C; e 10 min a 72 °C (Aarestrup et al., 2000).

- *erm(B)*: 3 min a 93 °C; 35 ciclos de 1 min a 93 °C, 1 min a 57 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C (Sutcliffe et al., 1996).

Um isolado positivo para a presença dos genes testados, obtido em estudo anterior, foi utilizado como controle positivo: *E. faecalis* 612 (Medeiros, 2011). Os produtos de PCR foram analisados em gel de eletroforese com 1,5% de agarose, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

3.10 Detecção dos fatores de virulência *ge/E*, *cy/A*, *ace* e *asa*

Em todos os isolados foi analisada a presença dos genes para gelatinase (*ge/E*), citolisina (*cy/A*), adesina de colágeno (*ace*) e substância de agregação (*asa*), através da PCR. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 4.

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total, conforme Medeiros (2011), e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*ge/E* - Invitrogen®; *cy/A*, *ace* e *asa* - IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C

e 1 min a 72 °C; e 10 min a 72 °C. Isolados positivos para a presença dos quatro genes, testados em trabalhos anteriores, foram utilizados como controles positivos: *E. faecalis* 523, 529, 546, 623 e 1233 (Medeiros, 2011). Os produtos de PCR foram analisados em gel de eletroforese com 1,5% de agarose, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *gelE* (gelatinase), *cylA* (citolisina), *ace* (adesina de colágeno) e *asa* (substância de agregação).

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
gelE_F	ACC CCG TAT CAT TGG TTT	402	Eaton & Gasson (2001)
gelE_R	ACG CAT TGC TTT TCC ATC		
cylA_TE17	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT	517	Eaton & Gasson (2001)
cylA_TE18	TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA		
ace1_F	AAA GTA GAA TTA GAT CAC AC	320	Mannu et al. (2003)
ace2_R	TCT ATC ACA TTC GGT TGC G		
asa_F	GAT ACA AAG CCA ATG TCG TTC CT	101	Shepard & Gilmore (2002)
asa_R	TAA AGA GTC GCC ACG TTT CAC A		

3.11 Detecção da produção da enzima gelatinase

A produção da atividade da enzima gelatinase foi verificada em todos os isolados enterococos em caldo BHI (Himedia®, India) contendo 4% de gelatina. Colônias crescidas a 37 °C por 24 h em placas de ágar BHI foram inoculadas por picada em tubos previamente refrigerados contendo 4 mL do caldo BHI com gelatina solidificada. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 24 h e posteriormente refrigerados a 4 °C por 30 minutos. Após esse período, as amostras que apresentavam o meio liquefeito foram consideradas positivas. As demais foram novamente incubadas durante 5 dias a 37 °C, e então novamente refrigeradas; naquelas em que o meio permaneceu sólido foi considerado o resultado negativo (Marra et al., 2007; Medeiros, 2011).

3.12 Detecção da enzima citolisina

A avaliação fenotípica da enzima citolisina foi realizada somente nos isolados que apresentaram resultado positivo para o gene da citolisina (*cyIA*). Isolados previamente crescidos em ágar BHI (Himedia®, Índia) a 37 °C por 24 h foram inoculados através de picada em ágar Müller Hinton (Acumedia®, Neogen, Michigan) contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado (NewProv), sendo incubadas a 37 °C durante 24 h. Após o período de incubação, conforme protocolo descrito por Semedo et al. (2003) para a detecção de hemolisina por *Enterococcus* spp., a presença de uma zona clara ao redor da colônia (β -hemólise) foi interpretada como positiva para a produção de hemolisina; zonas esverdeadas (α -hemólise) e ausência de zonas claras (γ -hemólise) foram consideradas negativas.

3.13 RAPD-PCR

A técnica de RAPD-PCR foi realizada baseada na metodologia de Costa et al. (2009), utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') (Huey & Hall, 1989). O volume final da reação foi de 25 μ L contendo: 1x de tampão de PCR (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen™), 200 μ M de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 2,4 μ M de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1U de *Taq* DNA polimerase *platinum* (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 segundos a 37 °C e 1 min a

72 °C; e 5 min a 72 °C. As reações de amplificação foram repetidas separadamente para cada uma das amostras pelo menos uma vez a fim de verificar a reprodutibilidade da técnica.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 80V por 60 minutos em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) (Ludwig Biotecnologia) em tampão TAE 1X (a partir do TAE 50X – 24,2% Tris, 5,71% Ácido Acético, 10% EDTA 0,5 M pH 8,0). O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o software Kodak Digital Science™ DC120. O padrão de fragmentos de DNA foi analisado através do programa Gel-Pro Analyzer e a estatística foi estabelecida pelo programa PAST.exe.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e incidência das espécies de *Enterococcus* spp. em amostras fecais de lobos-marinhos

4.1.1 *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos

Dez amostras fecais de lobos-marinhos das espécies *Arctocephalus australis* e *Arctocephalus tropicalis* serviram como material de referência para obtenção dos micro-organismos a serem analisados no presente estudo (Figura 7).

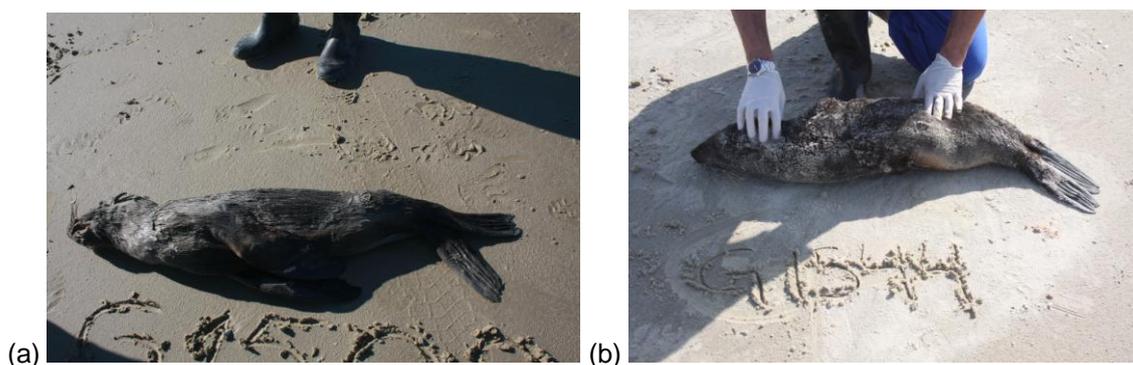


Figura 7. Dois exemplares de *Arctocephalus australis* encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul, em Palmares do Sul e Torres, respectivamente; (a) amostra **J** [G1508] e (b) amostra **B** [G1544]. Fonte: Arquivo GEMARS.

Segundo dados fornecidos pelo GEMARS a respeito das coletas realizadas nos meses de julho e agosto de 2012 (Tabela 5), as dez espécies

utilizadas para este trabalho foram encontradas no Estado do Rio Grande do Sul, distribuídas entre os municípios de Imbé, Torres, Xangri-lá, Pinhal, Praia das Cabras, Tramandaí, Capão da Canoa e Palmares do Sul.

Dos dez exemplares de lobos-marinhos, foram identificados nove *A. australis* e um *A. tropicalis*. Em relação aos animais da espécie *A. australis*, sete eram machos e dois eram fêmeas; já o lobo-marinho da espécie *A. tropicalis* era um macho. A massa corporal destes animais teve média de 11,86 Kg, com comprimento total médio do corpo de 94,64 cm. A classe etária de sete animais foi estimada com base na relação entre o comprimento total do corpo e o comprimento do côndilo basal (medida craniométrica), que evidenciou quatro subadultos (**C**, **D**, **F** e **J**) e três jovens (**A**, **E** e **H**). Em relação ao estado físico dos animais, todos estavam mortos, nove estavam em grau de decomposição 2 (*Code 2*) e um em grau 3 (*Code 3*), segundo critérios estabelecidos por Geraci (2005) (Tabela 5).

Tabela 5. Informações de coleta referentes aos lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) utilizados no estudo.

Identificação da amostra	Data da coleta	Registro	Município	Grau de decomposição	Espécie	Sexo	Massa (kg)	CT ^a (cm)	Classe etária
A (G1507)	09/07/2012	Chamada	Imbé	3	<i>A. australis</i>	M	12	92	jovem
B (G1544)	02/08/2012	Monitoramento	Torres	2	<i>A. australis</i>	M	10,4	88	-
C (G1534)	02/08/2012	Monitoramento	Xangri-lá	2	<i>A. australis</i>	F	15,25	101,4	subadulto
D (G1521)	26/07/2012	Monitoramento	Tramandaí	2	<i>A. australis</i>	M	9,5	92	subadulto
E (G1525)	27/07/2012	Chamada	Pinhal	2	<i>A. australis</i>	M	14,75	116,5	jovem
F (G1537)	02/08/2012	Monitoramento	Capão da Canoa	2	<i>A. tropicalis</i>	M	9	90,6	subadulto
G (G1516)	21/07/2012	Chamada	Tramandaí	2	<i>A. australis</i>	F	8,9	83	-
H (G1517)	24/07/2012	Chamada	Praia das Cabras	2	<i>A. australis</i>	M	13,5	90,9	jovem
J (G1508)	12/07/2012	Monitoramento	Palmares do Sul	2	<i>A. australis</i>	M	16	108	subadulto
L (G1514)	21/07/2012	Monitoramento	Tramandaí	2	<i>A. australis</i>	M	9,3	84	-

^aCT, comprimento total.

As 10 amostras de fezes foram identificadas com as letras **A, B, C, D, E, F, G, H, J** e **L**. De cada amostra foram selecionados aleatoriamente 20 isolados bacterianos, numerados de 1 a 20. Das dez amostras testadas inicialmente, oito foram positivas para o gênero *Enterococcus* spp.: amostras **B, C, D, E, F, G, J** e **L**. Desta forma, dos 200 isolados bacterianos submetidos aos testes seletivos a fim de obter somente cepas pertencentes ao gênero de interesse, 160 (80%) foram classificados como *Enterococcus* spp. e 40 (20%) isolados foram eliminados do estudo, por não apresentarem crescimento satisfatório em meio BHI contendo 6,5% de NaCl e pelo resultado positivo para o teste da catalase. Os 40 isolados eliminados do estudo eram provenientes das amostras **A** e **H**, ambas referentes a lobos-marinhos da espécie *A. australis*.

Os 160 isolados que permaneceram no estudo, após crescimento em caldo Azida Dextrose, apresentaram resultado negativo para o teste da catalase, mostraram-se capazes de crescer em meio BHI contendo 6,5% de NaCl e a 45 °C, além de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares. Não obstante, a morfologia dos isolados era característica de diplococos Gram-positivos.

4.1.2 Identificação das espécies por PCR Multiplex

Dos 160 isolados submetidos ao PCR Multiplex utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para as espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, 103 (64,38%) apresentaram amplificação compatível com uma das espécies testadas. Destes, 81 amplificaram o fragmento de DNA de 475 pb esperado para a espécie *E.*

faecalis, 18 o fragmento de DNA de 288 pb referente à espécie *E. casseliflavus*, 3 o fragmento de DNA de 173 pb para a espécie *E. gallinarum* e somente 1 amplificou o fragmento de DNA de 658 pb esperado para a espécie *E. faecium*. O resultado obtido pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Número de isolados de enterococos identificados por amostra pela técnica de PCR Multiplex.

Identificação da amostra	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	Não identificados
B	0	20	0	0	0
C	0	1	0	0	19
D	0	20	0	0	0
E	0	20	0	0	0
F	1	0	0	3	16
G	0	0	0	0	20
J	0	0	18	0	2
L	0	20	0	0	0
Total	1	81	18	3	57

Todos os isolados provenientes das amostras **B**, **D**, **E** e **L** amplificaram o fragmento de 475 pb esperado para a espécie *E. faecalis*. Dos 20 isolados provenientes da amostra **C**, somente 1 *E. faecalis* pode ser identificado pela técnica de PCR Multiplex. Na amostra **G** não houve resultado positivo para nenhum dos quatro oligonucleotídeos testados; já a amostra **F** apresentou 3 isolados pertencentes a *E. gallinarum*, 1 isolado *E. faecium* e 16 isolados não amplificaram com os oligonucleotídeos utilizados; para a amostra

J houve a identificação de 18 *E. casseliflavus* e 2 isolados não apresentaram resultados positivos para a PCR Multiplex. Todos os isolados que não foram identificados por PCR Multiplex tiveram a confirmação do gênero pelo PCR *tuf* antes de serem feitos os testes bioquímicos e o sequenciamento.

4.1.3 Confirmação do gênero pela detecção do gene *tuf*

Dos 160 isolados selecionados, 111 (69,4%) foram avaliados quanto à presença do gene *tuf*, característico do gênero *Enterococcus* spp., dos quais estavam incluídos os 57 que não puderam ser identificados pelo PCR Multiplex e mais 54 escolhidos aleatoriamente. O resultado positivo, observado para todos os isolados testados, foi considerado a partir da visualização do fragmento de 112 pb (Figura 8).

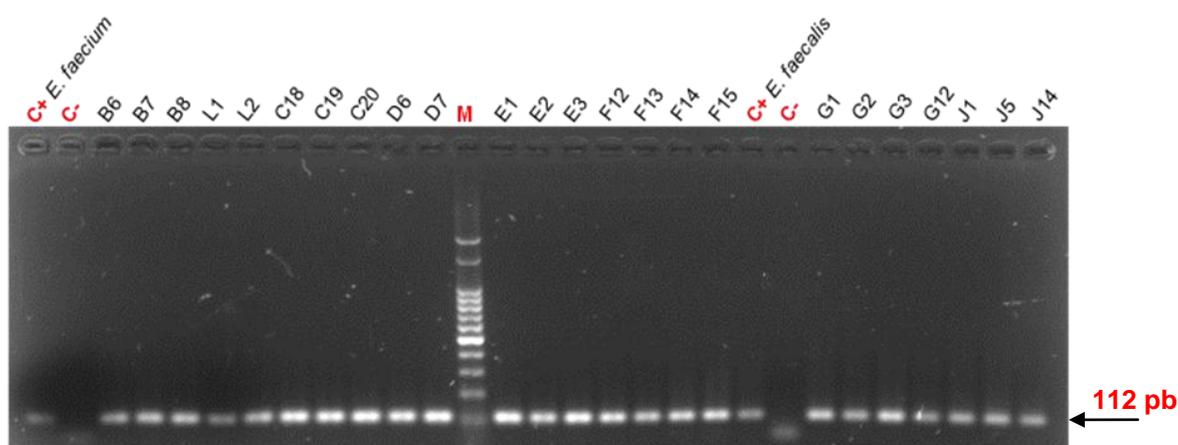


Figura 8. Gel de agarose da reação de PCR para o gene *tuf* (112 pb). Controles: (C+) *E. faecium* SS1274, (C+) *E. faecalis* ATCC 29212 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular de 100 pb.

4.1.4 Identificação bioquímica das espécies

Os 57 isolados negativos para a PCR Multiplex foram submetidos aos testes bioquímicos convencionais e, de acordo com Teixeira et al. (2011), somente 8 destes foram identificados em relação ao perfil bioquímico (Tabela

7). Sete foram identificados como *E. hirae* e um como *E. casseliflavus*. Quarenta e nove isolados não foram identificados quanto à espécie por apresentarem perfis atípicos em relação aos açúcares testados e foram selecionados para o sequenciamento da região 16S rRNA.

Tabela 7. Características fenotípicas de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies	n ^x	Características fenotípicas ^a									
		MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	SAC	PIR	MGP	TEL
<i>E. hirae</i>	7	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> ¹	20	-	-	+	-	-	- ^b	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> ²	13	-	-	+	-	-	- ^b	+	+ ^b	-	-
<i>E. hirae</i> ³	2	+ ^b	-	+	-	+ ^b	- ^b	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> ⁴	2	+ ^b	-	+	-	+ ^b	- ^b	+	+ ^b	-	-
<i>E. hirae</i> ⁵	8	-	-	+	-	-	+	+	+ ^b	-	-
<i>E. hirae</i> ⁶	1	-	-	+	-	+ ^b	+	+	+ ^b	-	-
<i>E. hirae</i> ⁷	1	-	-	+	-	+ ^b	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> ⁸	1	+ ^b	-	+	-	-	+	+	+ ^b	-	-
<i>E. mundtii</i>	1	+	-	+	+	+	- ^b	+	+ ^b	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Total	57										

¹⁻⁸ perfis bioquímicos atípicos; ^x número de isolados com o perfil bioquímico. ^aMAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; SAC, sacarose; PIR, piruvato; MGP, metil- α -D-glicopiranosídeo; TEL, telurito de potássio. ^bCaracterísticas atípicas.

4.1.5 Análise do sequenciamento

Dos 49 isolados que não foram identificados em nível de espécie, foram selecionados 14 que representavam os grupos com atipias bioquímicas e

um *E. casseliflavus* identificado pelo PCR Multiplex, os quais foram submetidos ao sequenciamento da região 16S rRNA. Na Tabela 8 pode-se observar os 15 isolados selecionados, os resultados do sequenciamento e as atipias para a fermentação ou não dos açúcares.

Tabela 8. Isolados selecionados para sequenciamento e características fenotípicas de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Isolado	Sequenciamento	Perfil bioquímico atípico
C1	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
C10	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Man+ Sbi+
C13	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Sbi+ Pir+
F2	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Man+ Sbi+ Pir+
F7	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
F17	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Man+ Pir+
G2	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Man+ Sbi+ Pir+
G4	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf-
G7	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
G8	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
G14	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
G15	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> Raf- Pir+
J1	<i>E. casseliflavus</i>	-
J5	<i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i> Raf- Pir+
J14	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. casseliflavus</i>

4.1.6 Distribuição das espécies

Após reunir os dados das identificações por PCR Multiplex, bioquimismo e sequenciamento, observou-se que a espécie mais frequentemente detectada foi *E. faecalis* (50,62%), seguida de *E. hirae* (34,37%), *E. casseliflavus* (11,87%), *E. gallinarum* (1,87%), *E. mundtii* (0,62%)

e *E. faecium* (0,62%). A distribuição das espécies de enterococos isolados das fezes dos lobos-marinhos pode ser observada na Figura 9.

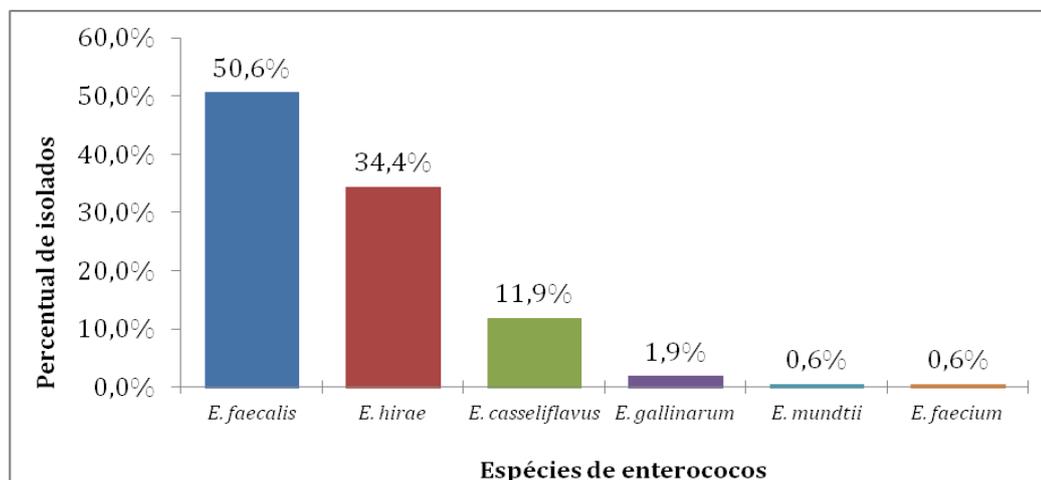


Figura 9. Percentual de espécies de enterococos da microbiota intestinal de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.), calculado sobre o total de isolados (n=160) de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais destes animais, encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Em relação à distribuição das espécies por amostra, observou-se que cinco (**B**, **D**, **E**, **L** e **G**) das oito amostras apresentaram somente uma espécie, sendo que as amostras **B**, **D**, **E** e **L** eram compostas somente por representantes da espécie *E. faecalis*, e a amostra **G** somente pela espécie *E. hirae*. A amostra **J** apresentou duas espécies diferentes: *E. casseliflavus* e *E. mundtii*. Da mesma forma, a amostra **C** apresentou duas espécies distintas: *E. faecalis* e *E. hirae*. Já a amostra **F** foi a que apresentou maior variação, com três espécies diferentes: *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. faecium*.

4.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Os resultados do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, observado para os 160 isolados testados, pode ser verificado na Tabela 9.

Considerando o total de isolados, 58,13% (93/160) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Avaliando cada antibiótico individualmente, todos os isolados foram sensíveis a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina e vancomicina. As propriedades de resistência foram mais frequentemente encontradas para eritromicina (21,25%), nitrofurantoína (15,62%), tetraciclina (6,25%), norfloxacina (3,12%) e ciprofloxacina (3,12%).

Tabela 9. Distribuição dos padrões de resistência antimicrobiana a partir do número de isolados de cada espécie com algum nível de resistência, em *Enterococcus* spp. obtidos das amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies (n ^a)	AMP*	CIP*	CLO*	ERI*	EST*	GEN*	NIT*	NOR*	TET*	VAN*
<i>E. faecalis</i> (n=81)	0	4	0	11	0	0	0	5	0	0
<i>E. hirae</i> (n=55)	0	0	0	3	0	0	12	0	10	0
<i>E. casseliflavus</i> (n=19)	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i> (n=3)	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>E. mundtii</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i> (n=1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Total	0	5	0	34	0	0	16	5	10	0

n^a= número de isolados de cada espécie. *Antibióticos: ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

Em relação à distribuição da suscetibilidade entre as amostras, verificou-se que os isolados da amostra **E** eram sensíveis aos antimicrobianos testados. As demais amostras apresentaram pelo menos um isolado com perfil resistente.

Considerando o número de isolados de cada espécie com resistência, distribuídos nas oito amostras estudadas, verificou-se que todos os *E.casseliflavus*, *E.gallinarum* e *E. faecium* foram resistentes a um ou mais

antimicrobianos testados. Do total de 55 *E. hirae*, 45,45% (25/55) foram resistentes, sendo 3 para eritromicina, 12 para nitrofurantoína e 10 para tetraciclina. Entre os 81 *E. faecalis*, 23,46% (19/81) apresentaram algum tipo de resistência (3 para ciprofloxacina, 11 para eritromicina, 4 para norfloxacina e 1 para ciprofloxacina e norfloxacina). Por outro lado, o único isolado *E. mundtii* não apresentou qualquer resistência contra nenhum dos antibióticos testados.

4.2.1 Presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)* relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina

Os genes *tet(L)* e *tet(M)* foram testados nos dez *E. hirae* resistentes à tetraciclina, isolados da amostra **C**. Os resultados quanto à presença e ausência para estes genes podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Presença e ausência dos genes *tet(L)* e *tet(M)* em *E. hirae* resistentes à tetraciclina, obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Isolado	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>
C3	0	0 ^b
C4	0	1 ^a
C6	0	0
C7	0	0
C9	0	1
C10	0	0
C12	0	1
C14	0	0
C17	0	0
C18	0	0
Total	0	3

^a1 = presença; ^b0 = ausência.

Não foi possível detectar o gene *tet(L)* em nenhum dos isolados testados. Três isolados (C4, C9 e C12) apresentaram o gene *tet(M)*, enquanto os demais (C3, C6, C7, C10, C14, C17 e C18) não apresentaram nem o *tet(L)* e nem o *tet(M)*.

Em relação ao gene *erm(B)*, avaliado em 34 isolados resistentes à eritromicina, somente 5,9% (2/34) apresentaram o gene pesquisado. Estes isolados (J2 e J3) são da espécie *E. casseliflavus* e pertencem à mesma amostra de origem (J).

4.3 Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados

Todos os isolados foram analisados quanto à presença dos genes *gelE*, *cylA*, *ace* e *asa*, envolvidos com a virulência, por PCR. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Distribuição dos genes de virulência *gelE*, *cylA*, *ace* e *asa*, entre as espécie de *Enterococcus* spp. obtidos das amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies (n ^a)	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>ace</i>	<i>asa</i>
<i>E. faecalis</i> (n=81)	62	4	76	9
<i>E. hirae</i> (n=55)	12	0	18	9
<i>E. casseliflavus</i> (n=19)	5	0	12	1
<i>E. gallinarum</i> (n=3)	1	0	1	0
<i>E. mundtii</i> (n=1)	1	0	0	0
<i>E. faecium</i> (n=1)	0	0	0	0
Total	81	4	107	19
(%)	(50,62)	(2,5)	(66,87)	(11,87)

n^a = número de isolados de cada espécie.

Dos 160 isolados, 69,4% (111/160) apresentaram pelo menos um dos genes testados, sendo a maior incidência observada para os genes *ace* (66,87%) e *geE* (50,62%), e menor incidência para *asa* (11,87%) e *cylA* (2,5%).

Em relação às amostras analisadas, a que apresentou menor número de isolados com o gene *ace* foi a **G**, composta exclusivamente por *E. hirae*. Em três amostras (**B**, **D** e **E**) todos os isolados apresentaram o gene *ace*. O percentual de espécies que apresentaram o gene, considerando o total de cada espécie, destacou maior incidência do gene com 93,8% (76/81) dos *E. faecalis*, seguido por 63,2% (12/19) dos *E. casseliflavus*, 33,3% (1/3) dos *E. gallinarum* e 32,7% (18/55) dos *E. hirae*. Os isolados *E. mundtii* e *E. faecium* não apresentaram o gene *ace*.

A amostra **L**, composta por *E. faecalis*, foi a que apresentou somente dois isolados com o gene *geE*. As amostras **D** e **E**, também compostas por *E. faecalis*, apresentaram o gene em todos os isolados. Em relação às espécies ponderadas, 100% (1/1) dos *E. mundtii* apresentaram o gene *geE*, seguido por 76,5% (62/81) dos *E. faecalis*, 33,3% (1/3) dos *E. gallinarum*, 26,3% (5/19) dos *E. casseliflavus* e 21,8% (12/55) dos *E. hirae*; o isolado *E. faecium* não apresentou o gene.

Referente à distribuição entre as amostras, o gene *asa* foi detectado em seis das oito amostras avaliadas. As amostras que não tiveram isolados com este gene foram a **L** e a **G**. Nas demais amostras, o número de enterococos contendo o gene *asa* variou de um a seis isolados por amostra. Em relação à distribuição entre as espécies, este gene esteve presente em três

das seis espécies identificadas: 16,4% (9/55) em *E. hirae*, 11,1% (9/81) em *E. faecalis* e 5,3% (1/19) em *E. casseliflavus*.

O gene *cyIA* foi detectado em 4 isolados da espécie *E. faecalis*, representando 4,9% (4/81) do total identificado para esta espécie, sendo um deles da amostra **B** e os outros três da amostra **D**. As outras seis amostras não apresentaram isolados em que este gene tenha sido detectado.

4.3.1 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina

A atividade da enzima gelatinase foi investigada nos 160 isolados. Entre os 81 isolados em que foi possível detectar o gene *gelE*, 27,2% (22/81) expressaram fenotipicamente a enzima. Em dois isolados negativos para *gelE* (B15 e C11) foi possível observar o fenótipo positivo para gelatinase.

A expressão da citolisina foi avaliada somente para os isolados positivos para o gene *cyIA*. Nos quatro isolados positivos para o gene (B9, D7, D9 e D10) não foi possível detectar a expressão da enzima citolisina, uma vez que não foi verificada hemólise em meio ágar sangue.

4.4 Relação entre perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência

Nos 93 isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados, o gene *ace* foi detectado em 72% (67/93), seguido por *gelE*, presente em 62,4% (58/93), *asa*, em 8,6% (8/93) e *cyIA*, com 4,3% (4/93).

Dos 34 isolados resistentes à eritromicina, 61,8% (21/34) apresentaram o gene *ace*, seguido por *gelE*, em 26,5% (9/34), *asa*, em 5,9% (2/34) e o gene *cyIA* não foi detectado entre estes isolados. Entre os 16

isolados com resistência à nitrofurantoína, o gene *ace* foi detectado em 37,5% (6/16) dos isolados, seguido por *asa*, em 25% (4/16), *geE*, presente em 12,5% (2/16), e o gene *cyIA* não foi detectado entre estes isolados. Quando avaliados os 10 isolados com resistência à tetraciclina, observou-se que os genes *ace* e *geE* foram detectados em 50% dos isolados (5/10), seguido pelo *asa*, presente em 40% (4/10), e o gene *cyIA* não foi detectado entre estes isolados. Dentre os 5 isolados com resistência à norfloxacin, o gene *ace* foi detectado em todos eles (100%), já o gene *geE* foi positivo em 80% (4/5), o *asa* esteve presente em 20% (1/5) e o gene *cyIA* não foi detectado entre estes isolados. Dos 5 isolados avaliados com resistência à ciprofloxacina, o gene *ace* foi detectado em 80% (4/5), o *geE* em 60% (3/5), enquanto os genes *asa* e *cyIA* não foram detectados.

Entre os 67 isolados deste estudo que apresentaram resistência, 40,63% (65/160) apresentaram esta característica a somente um dos antimicrobianos testados. Os isolados *E. faecalis* (L7) e *E. faecium* (F12) foram os únicos que apresentaram resistência a mais de um antibiótico, sendo eles ciprofloxacina e norfloxacin, para L7, e ciprofloxacina, eritromicina e nitrofurantoína, para F12. Para estes isolados, no caso do *E. faecalis*, que apresentou resistência intermediária frente a dois antibióticos da mesma classe (quinolonas), o único gene relacionado a virulência detectado foi o *ace*. Já para o *E. faecium*, que apresentou resistência significativa para ciprofloxacina e resistência intermediária para eritromicina e nitrofurantoína, sendo os três pertencentes a classes diferentes (quinolonas, macrolídeos e nitrofurantoínas, respectivamente), não foi detectado nenhum dos genes de virulência testados.

4.5 Correlação filogenética das espécies por RAPD-PCR

4.5.1 Avaliação entre os isolados de cada amostra

A análise do perfil genotípico dos *E. faecalis* da amostra **B** demonstrou que todos os isolados apresentavam dois fragmentos de DNA (1910 pb - 1215 pb). Neste caso, a similaridade foi considerada total (100%). Apesar de alguns isolados apresentarem um fragmento de tamanho maior do que os outros dois fragmentos prevalentes, como pode-se observar para os isolados B2, B5 e B6 (Figura 10), este não foi considerado, pois teve pouca intensidade e não se manteve reproduzível nas repetições do teste.

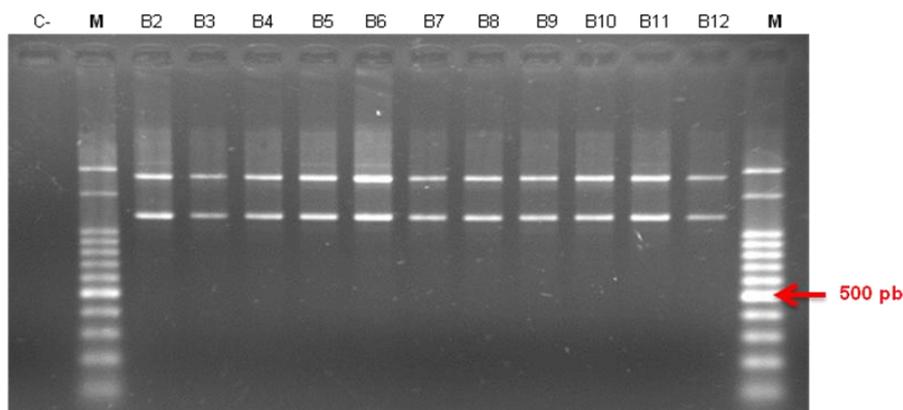


Figura 10. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **B**, de *A. australis*. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

A análise da amostra **C**, composta por 1 *E. faecalis* e 19 *E. hirae*, apresentou dois perfis distintos. O isolado *E. faecalis* apresentou três fragmentos de DNA de 1910 pb, 1060 pb e 910 pb, enquanto que 18 *E. hirae* apenas um fragmento de 960 pb. O isolado *E. hirae* (C18) apresentou o mesmo perfil de bandas do isolado *E. faecalis* (C2) (Figura 11).

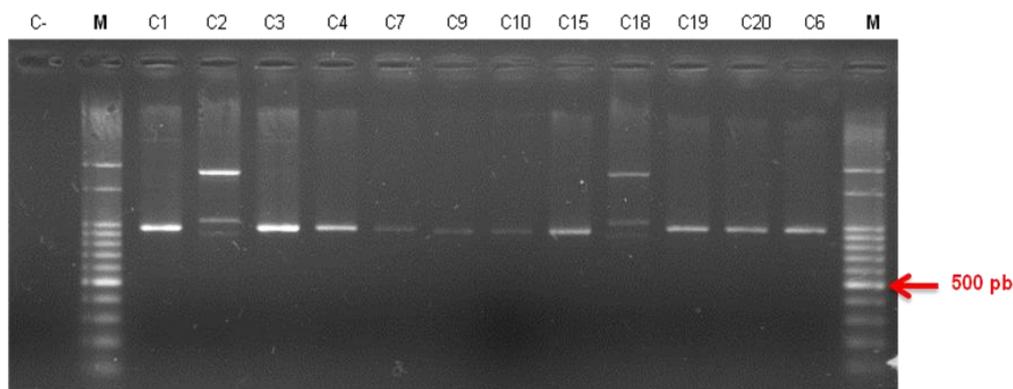


Figura 11. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **C**, de *A. australis*. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

A análise da amostra **D**, composta por *E. faecalis*, da mesma forma como a amostra **B**, apresentou similaridade de 100% entre os isolados que a compõem. Houve a revelação de três fragmentos após o ensaio, sendo dois de 1910 pb e 1215 pb, do mesmo tamanho que os dois fragmentos encontrados na amostra **B**, e um terceiro de 1060 pb (Figura 12).

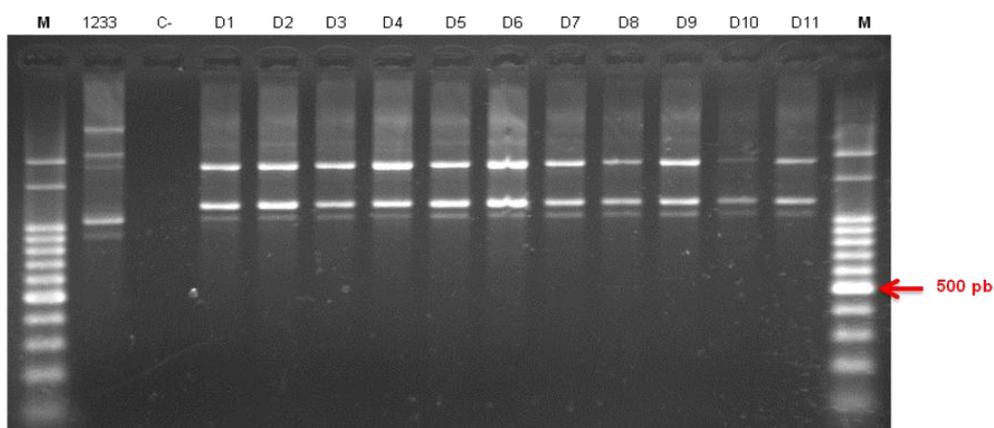


Figura 12. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **D**, de *A. australis*. (1233) Controle interno. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

A análise da amostra **E**, composta por *E. faecalis*, assim como as amostras **B** e **D**, apresentou similaridade de 100% entre os isolados integrantes

da amostra. Foi possível visualizar a presença de três fragmentos semelhantes aos apresentados na amostra **D**, sendo considerados, para fins de análise da similaridade, de mesmo tamanho (Figura 13).

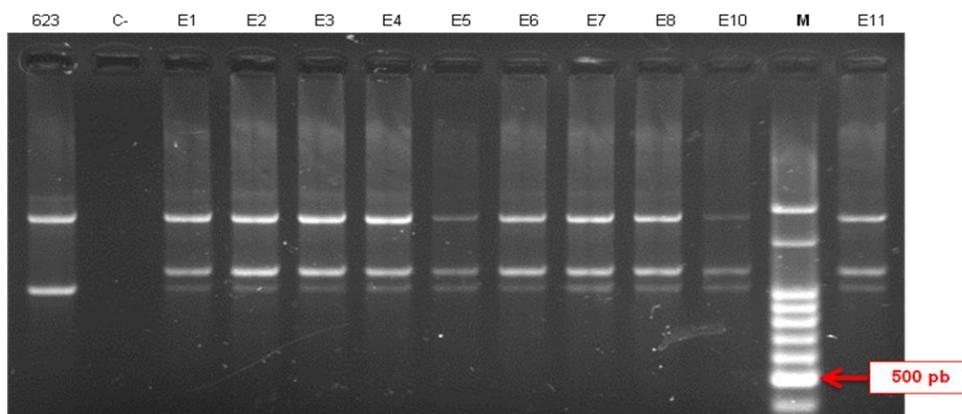


Figura 13. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **E**, de *A. australis*. (623) Controle interno. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

Na análise da amostra **F**, composta por *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. hirae*, não foi possível estabelecer uma diferença filogenética entre os isolados das espécies *E. gallinarum* e *E. hirae*, uma vez que, apesar da detecção de outros fragmentos fortes para alguns isolados, esse resultado não obteve repetições constantes. Por conseguinte, com o propósito de evitar considerações errôneas referentes à similaridade entre os isolados, considerou-se somente o fragmento de 960 pb para fins de comparação (Figura 14.a). Dessa forma, através da adoção de critérios comparativos entre a visualização do gel de agarose e o padrão de bandas indicado pelo programa Gel-Pro Analyzer, obteve-se um índice de similaridade de 100% para os isolados das espécies *E. gallinarum* e *E. hirae* presentes nesta amostra. O isolado *E. faecium*, encontrado nesta amostra, apresentou dois fragmentos, sendo um deles de 2165 pb e o outro de 1000 bp (Figura 14.b).

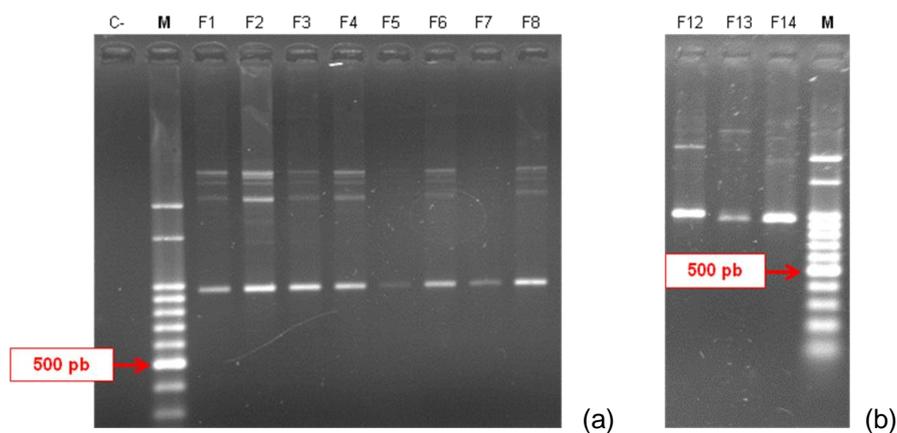


Figura 14. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **F**, de *A. tropicalis*. (a) *E. gallinarum* representados pelos isolados F1, F3 e F4; *E. hirae* representado pelos isolados F2, F5, F6, F7 e F8. (b) *E. faecium* representado pelo isolado F12; *E. hirae* representado pelos isolados F13 e F14. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

A análise da amostra **G**, composta por *E. hirae*, obteve similaridade total (100%) entre seus isolados, sendo observados padrões semelhantes aos da amostra **F** (Figura 15). Da mesma forma, em virtude da não observância de todos os fragmentos nas repetições, foi considerado somente o fragmento de 960 pb, que esteve presente em todas as repetições.

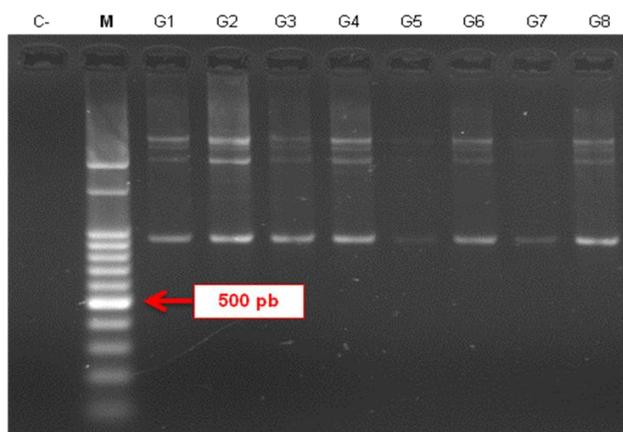


Figura 15. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **G**, de *A. australis*. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

Na análise da amostra **J**, composta por *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, foi possível observar a revelação de cinco fragmentos distintos (Figura 16), estando dois deles, de 1685 pb e 1150 pb, presentes somente no isolado *E. mundtii* (J5), e os outros três fragmentos (2240 pb, 1795 pb e 1555 pb) compondo o perfil dos isolados *E. casseliflavus*. Desta forma, pode-se considerar que a similaridade entre os isolados da espécie *E. casseliflavus* foi de 100% e que o isolado *E. mundtii* não apresenta homologia com os demais micro-organismos desta amostra.

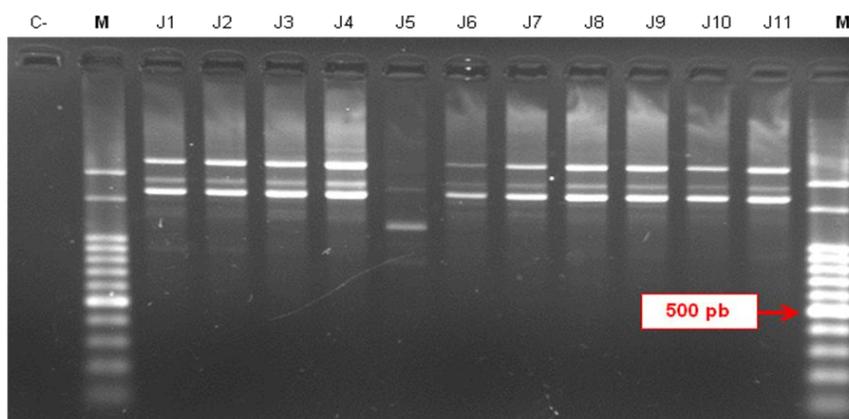


Figura 16. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **J**, de *A. australis*. J1-J4, J6-J11 = *E. casseliflavus*; J5 = *E. mundtii*. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

A análise da amostra **L**, composta por *E. faecalis*, apresentou 100% de similaridade entre seus isolados. Apesar de ser possível visualizar seis fragmentos em vários dos integrantes desta amostra, considerou-se somente os quatro fragmentos (2200 pb, 1910 pb, 1060 pb e 910 pb) de maior intensidade e que se mantiveram constantes durante as repetições (Figura 17).

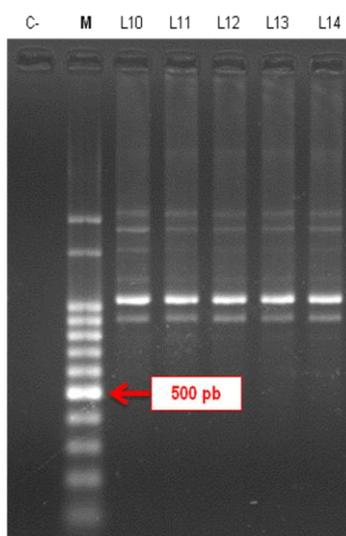


Figura 17. Padrão obtido pela técnica de RAPD-PCR para isolados da amostra **L**, de *A. australis*. M = marcador molecular 100 pb; (C-) = controle negativo sem adição de DNA microbiano.

4.5.2 Avaliação da correlação das espécies de enterococos isolados de diferentes amostras

A correlação entre todos os isolados obtidos foi realizada considerando-se os 13 fragmentos (2240 pb, 2200 pb, 2165 pb, 1910 pb, 1795 pb, 1685 pb, 1555 pb, 1215 pb, 1150 pb, 1060 pb, 1000 pb, 960 pb e 910 pb) detectados nas análises por RAPD-PCR. A análise do dendrograma, apresentado na Figura 18, demonstra a existência de cinco grupos distintos, denominados de I a V.

O Grupo I foi representado somente pelo isolado J5 (*E. mundtii*), ao apresentar um perfil único por esta técnica (fragmentos 1685 pb e 1150 pb). Este isolado não apresentou relação com os outros integrantes da amostra **J**, identificados como *E. casseliflavus*, tampouco com os demais micro-organismos analisados neste estudo, estruturando um ramo distinto. Da mesma forma, o único representante encontrado da espécie *E. faecium* (F12)

formou um ramo separado que exemplifica a ausência de similaridade com os demais, por apresentar os fragmentos 2165 pb e 1000 bp, identificado como Grupo III.

O Grupo II, formado com os outros 19 isolados da amostra **J**, demonstrou 100% de similaridade entre os *E. casseliflavus* identificados (2240 pb, 1795 pb e 1555 pb) e nenhuma similaridade com os demais isolados.

Um grande grupo, denominado Grupo IV, formado quase que em sua totalidade pela espécie *E. faecalis*, apresentou índice de similaridade de Jaccard entre 0,3 - 0,4, incluindo todos os isolados das amostras **B**, **D**, **E** e **L**, e ainda, os isolados C2 e C18 da amostra **C**. Dentre estes, os isolados das amostras **D** e **E** apresentaram 100% de similaridade, pois foi possível detectar três fragmentos comuns em todos os isolados (1910 pb, 1215 pb e 1060 pb). Estas duas amostras apresentaram ainda uma similaridade maior que 0,6 com os *E. faecalis* da amostra **B** (1910 pb - 1215 pb). Similaridade ainda maior (>0,7) foi observada entre os micro-organismos da amostra **L** (2200 pb, 1910 pb, 1060 pb e 910 pb) e os dois isolados da amostra **C** (C2 e C18), que também revelaram os fragmentos 1910 pb, 1060 pb e 910 pb. O isolado C18, identificado por testes bioquímicos como sendo *E. hirae*, apresentou perfil idêntico ao isolado C2, *E. faecalis*, identificado por PCR Multiplex.

Um quinto grupo (Grupo V) inclui os isolados das amostras **C** (C1, C3-C17, C19-C20), **F** (F1-F11, F13-F20) e **G**. Destes, 54 foram identificados como *E. hirae* e três (F1, F3 e F4) como *E. gallinarum*. Estes micro-organismos apresentaram índice de similaridade de Jaccard total (100%), baseada no único fragmento intenso e reprodutível o qual exibiram (960 pb). Apesar de os

isolados das amostras **F** e **G** apresentarem vários representantes com outros fragmentos semelhantes, o que poderia indicar maior similaridade entre os isolados destas amostras, não foi possível, pela técnica de RAPD-PCR, precisar sobre essa diferenciação com os isolados da amostra **C**, em virtude da falta de repetibilidade dos fragmentos.

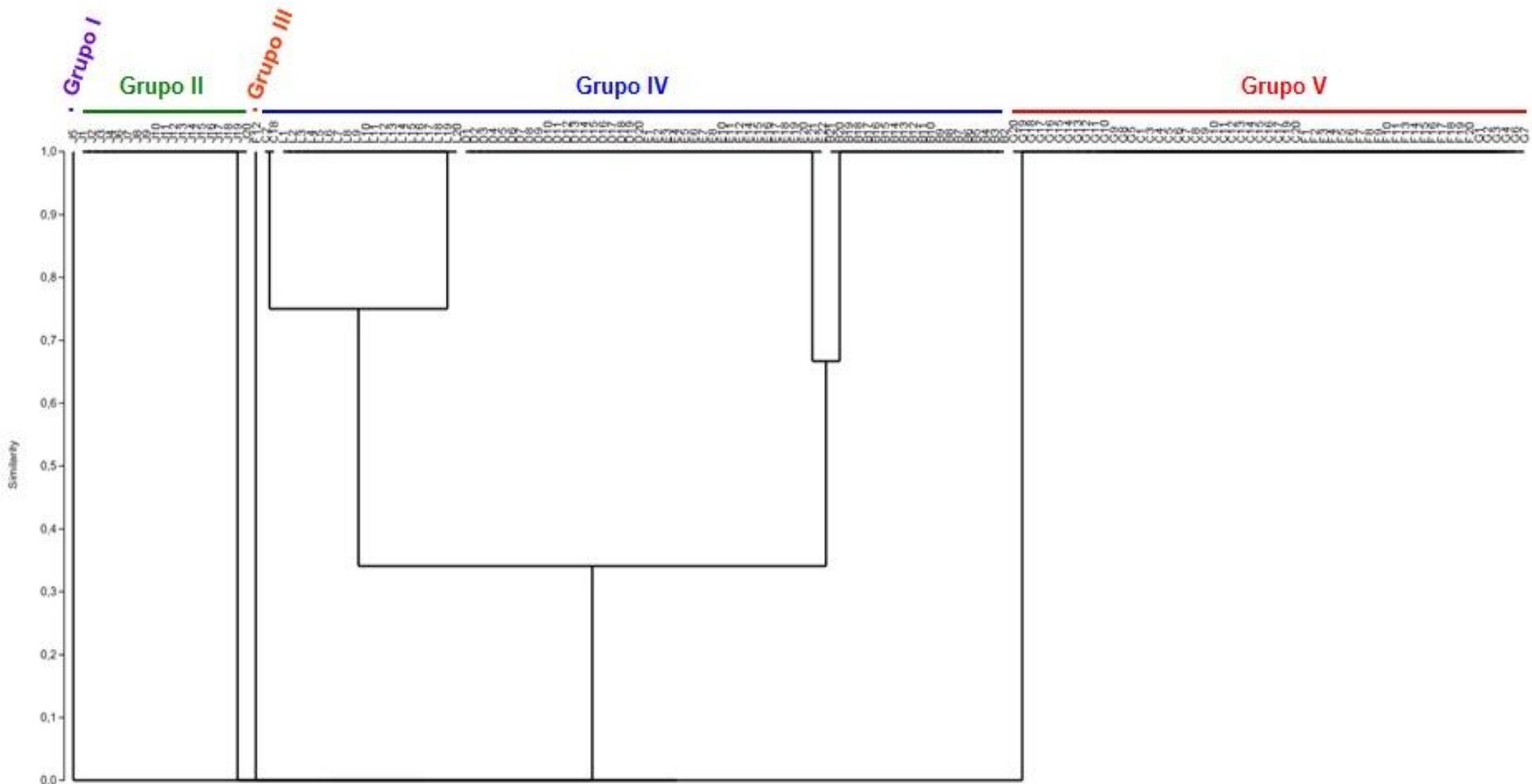


Figura 18. Dendrograma (Programa Past.exe) obtido pela técnica de RAPD-PCR, após análise em gel de agarose e detecção de fragmentos pelo programa Gel-Pro Analyzer, para *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Grupos I, II, III, IV e V organizados conforme índice de similaridade de Jaccard.

5. DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de *Enterococcus* spp. em amostras fecais de lobos-marinhos

A escassez de estudos que avaliam a microbiota de mamíferos marinhos, mais especificamente sobre enterococos do trato gastrointestinal, impossibilitou a comparação direta dos resultados obtidos no presente trabalho. No entanto, a fim de compreender as possíveis vias de disseminação destes micro-organismos, também foram avaliados nos ambientes marinhos e costeiros alguns nichos extraentéricos onde enterococos são rotineiramente isolados. Entre as áreas com potencial dispersão de linhagens, considerou-se água, solo e sedimentos, vegetação aquática e terrestre, bem como organismos que habitam ou frequentam as regiões litorâneas, preferencialmente de amostras de animais relacionados, além de isolados clínicos, que servem de referência para estudos com enterococos.

Entre as espécies de lobos-marinhos de ocorrência no litoral do Rio Grande do Sul, a mais frequentemente encontrada, *A. australis*, resultou em um número de espécimes amostradas maior do que da espécie *A. tropicalis*. Essa diferença não permitiu realizar a avaliação separadamente, considerando a distribuição das espécies de enterococos entre as duas espécies de lobos-

marinhos e, assim, estabelecer relações entre a distribuição geográfica distinta de *A. australis* e *A. tropicalis* e as espécies microbianas encontradas. Diante disso, as discussões apresentadas a seguir considerarão os resultados sobre as duas espécies de lobos-marinhos do gênero *Arctocephalus* spp. encontradas durante os períodos de coleta das amostras.

A transição entre os habitats heterotérmicos, em que as temperaturas são variáveis, e o trato gastrointestinal dos animais, um ambiente rico em nutrientes e com temperatura relativamente constante, expõe a sobrevivência dos enterococos, e mesmo assim estes micro-organismos parecem resistir a essas variações e se disseminar (Lebreton et al., 2014). O trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais representa o maior reservatório de enterococos. Apesar disso, os níveis de recuperação destes micro-organismos podem ser baixos, e a composição da microbiota em relação às dietas específicas de alguns destes animais pode determinar a capacidade de sobrevivência em seus aparelhos gatrointestinais (Lebreton et al., 2014).

Nos lobos-marinhos, apesar de haver crescimento microbiano nas amostras **A** e **H**, não foi possível obter isolados de *Enterococcus* spp. nestas amostras. Uma possível explicação é que outro grupo de bactérias predominasse no trato gastrointestinal. Além disso, a amostra **A** era proveniente de um animal que apresentava grau de decomposição mais acentuado (*Code* 3), o que pode ter influenciado no isolamento de enterococos.

Muitos dos estudos que buscam isolar enterococos não conseguem obtê-los de todas as amostras. Nos casos de isolamento através de técnicas cultiváveis, a própria metodologia pode ser um limitante. Um estudo realizado

por Layton et al. (2010) empregando amostras fecais de mamíferos marinhos, a fim de avaliar a validade de se rastrear enterococos como indicadores da qualidade de águas recreativas na Califórnia (EUA), também não conseguiu isolar estes micro-organismos de todas as amostras de mamíferos utilizadas no estudo. Embora tenha sido possível obtê-los das quatro amostras de focas examinadas, nos leões-marinhos, grupo mais estreitamente relacionado aos lobos-marinhos, somente 57% (8/14) das amostras foram positivas para enterococos. No estudo de Ryu et al. (2013), a detecção molecular com base na análise da sequência do gene 16S rRNA mostrou que, dos 439 isolados ambientais de fezes e de águas costeiras, aproximadamente 91% foram identificados como *Enterococcus* spp., ao passo que o restante foi classificado como de outro gênero.

Jiménez et al. (2013), avaliando a presença de enterococos em leite materno de diferentes espécies de animais, observaram que 100%, 85%, 50%, 25% e 25% das amostras de suínos, humanos, felinos, caninos e ovinos, respectivamente, eram positivos. A comparação com o leite materno deve-se ao fato de que alguns lobos-marinhos foram encontrados ainda jovens, o que insinua que a presença de enterococos no trato gastrointestinal seja de ocorrência natural e que possa ser originária, em parte, a partir do leite materno, uma vez que estes mamíferos são amamentados em suas colônias de origem entre aproximadamente 8-12 meses antes de saírem para o período de migrações (Vaz-Ferreira, 1987). Além disso, Katz et al. (2012), em estudo parasitológico de *A. australis* no Uruguai, apontam que além da cadeia

alimentar, a rota lactogênica constitui uma fonte adicional de organismos patogênicos para o trato gastrointestinal de filhotes de pinípedes.

Em relação à distribuição das espécies de enterococos nas fezes dos lobos-marinhos, foram identificadas seis espécies, sendo a maioria das amostras composta por somente uma espécie. A amostra com maior diversidade foi também o único exemplar de *A. tropicalis*, podendo haver relação com a alimentação durante a trajetória de migração diferenciada dos outros lobos-marinhos.

Quando foi possível observar mais de um tipo de espécie, houve um predomínio superior a 80% das espécies *E. hirae* e *E. casseliflavus*. Nas amostras de leite materno investigadas por Jiménez et al. (2013) também houve um máximo de três espécies diferentes em somente uma amostra de leiteoa (*E. faecalis*, *E. hirae* e *E. faecium*), enquanto apenas uma espécie de enterococos foi detectada nas amostras de leite de caninos, felinos e humanos. Esse predomínio de espécies por amostra pode ser influenciado pela idade, caminho migratório percorrido e/ou composição da dieta do animal.

A maioria das pesquisas abrangendo o gênero *Enterococcus* de fontes relacionadas às regiões costeiras é desenvolvida a fim de avaliar os riscos à saúde humana. Os enterococos, juntamente com a espécie *E. coli*, são considerados organismos indicadores de contaminação fecal e sua investigação é recomendada por órgãos responsáveis pela qualidade microbiológica de águas recreativas e água potável nos Estados Unidos e outros países (Ferguson et al., 2005; Lu et al., 2008; Phillips et al., 2011;

Heaney et al., 2012; Bennani et al., 2012; Mote et al., 2012; Byappanahalli et al., 2012; Ryu et al., 2013).

Phillips et al. (2011) investigaram a qualidade de águas recreativas e o risco à saúde de banhistas através de enterococos detectados em amostras de areia e de água da costa da Flórida (EUA), indicando a areia como um importante reservatório destes micro-organismos. Nas oito praias avaliadas, foram encontrados enterococos tanto nas amostras de água quanto nas de areia, sendo seus níveis relacionados às condições para uso recreativo da água. Os autores destacaram ainda o relato de gaivotas e outras aves marinhas que frequentam a costa nos locais avaliados, corroborando com o que apontam Lu et al. (2008) de que aves aquáticas são consideradas fontes de disseminação de micro-organismos devido ao seu hábito alimentar e caráter migratório, podendo difundir patógenos através das fezes.

Nessa mesma linha, Heaney et al. (2012) avaliaram a relação entre atividades desenvolvidas em contato com a areia da praia e o possível foco de doenças entéricas. A contaminação da areia pode ser oriunda do contato com resíduos de escoamento agrícola e urbano, de animais domésticos e selvagens e de banhistas. Neste estudo, além da avaliação microbiológica da areia, quase 5.000 banhistas foram entrevistados a respeito do tipo de contato e atividade realizada na praia e reportaram, após 10-12 dias, sobre sintomas físicos de doenças entéricas após a visita à praia, como diarreia, vômitos, náuseas e dores abdominais. Houve relação entre os níveis de *Enterococcus* spp. detectados na areia e o contato relatado pelos banhistas (cavar na areia ou ser enterrado, por exemplo) que desenvolveram sintomas de doenças

gastrointestinais. Os resultados do estudo sugerem que a densidade de *Enterococcus* spp. na areia aumenta a taxa de doença entérica entre banhistas que têm contato com areia (Heaney et al., 2012).

Desta forma, animais marinhos que visitam a costa entram em contato com micro-organismos que podem ser oriundos do contato direto com humanos e outros animais que frequentam as praias ou durante as migrações, ou ainda com poluentes descartados nas proximidades das praias. Assim, a contaminação não precisa necessariamente ocorrer por via aquática, sendo a areia uma fonte de disseminação de micro-organismos. Layton et al. (2010) concluíram ainda que a detecção de enterococos em amostras de ambientes marinhos pode fornecer informações sobre a origem fecal e mesmo sobre a qualidade das águas recreativas, mas não é suficiente para inferir sobre riscos à saúde ou mesmo associar determinada espécie à análise das condições destes ambientes. Visto posto, a determinação da prevalência de enterococos em mamíferos marinhos auxilia o entendimento de que este ambiente é uma fonte deste gênero, devendo ser cautelosa a avaliação da qualidade da água por este método, mas também contribui para o estudo da ecologia das espécies marinhas e da possível incorporação de micro-organismos com caracteres adquiridos em ambientes seletivos.

5.2 Prevalência das espécies de *Enterococcus* spp. nas amostras fecais de lobos-marinhos

Em 1987, Devriese et al. (1987) descreveram as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* como sendo as mais comumente encontradas no intestino de mamíferos, enquanto outras espécies pareciam ser

ocasionais. No entanto, à medida que novos estudos foram sendo realizados e novas espécies descritas, suas associações com os hospedeiros foram sendo desvendadas, e ainda atualmente pode-se observar a identificação de novas espécies de *Enterococcus* spp. em diversos ambientes (Euzéby, 2014). Tanto a identificação quanto a caracterização contribuem para o entendimento de aspectos epidemiológicos e ecológicos do gênero *Enterococcus* de maneira a contribuir para que sejam estabelecidas as relações, benéficas ou não, entre micro-organismos, hospedeiros e ambiente como um todo (Arvanitidou et al., 2001). Lebreton et al. (2014), em revisão atualizada, descreveram uma série de investigações em diferentes partes do mundo a fim de categorizar a prevalência dos enterococos em animais selvagens dos mais variados habitats, e também para assinalar outros aspectos destes micro-organismos.

De acordo com Stewart et al. (2014), a contaminação das águas costeiras pode transportar patógenos e contaminantes causadores de doenças em seres humanos e em animais, e estes agentes podem ser transportados através da água para áreas onde eles não são nativos. Nesse sentido, os mamíferos marinhos podem ser indicadores de potenciais efeitos na saúde do ecossistema. Entretanto, até o momento, a diversidade de *Enterococcus* spp. em hospedeiros mamíferos de áreas costeiras não foi totalmente caracterizada (Layton et al., 2010). No estudo de Layton et al. (2010), os perfis dos enterococos identificados em amostra de leões-marinhos e focas foram muito similares aos das amostras de cães, humanos e gaivotas que habitavam/frequentavam as regiões próximas à baía em que os animais marinhos tiveram as fezes coletadas, e de esgoto, ressaltando a natureza

ubíqua destes micro-organismos e a influência do habitat sobre as populações que compõem o trato gastrointestinal de diferentes animais.

No presente estudo, a utilização das técnicas de PCR Multiplex, bioquimismo e sequenciamento permitiu a estimativa da prevalência de enterococos nas fezes de oito lobos-marinhos. Observou-se que a espécie mais frequentemente detectada foi *E. faecalis*, seguida de *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii* e *E. faecium*. Estudos avaliando a diversidade de enterococos em águas do ambiente têm apresentado composição semelhante, sendo *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. durans* e *E. mundtii* as espécies mais frequentemente isoladas (Ryu et al., 2013).

Poeta et al. (2005) obtiveram 140 enterococos a partir de amostras fecais de aves, mamíferos e outros animais selvagens. A prevalência detectada entre as espécies foi de *E. faecalis* (52,1%), *E. faecium* (32,1%), *E. hirae* (10,0%), *E. casseliflavus* (2,8%), *E. gallinarum* (1,4%) e *Enterococcus* spp. (1,4%). Não obstante, estas espécies revelam-se recorrentes em uma vasta diversidade de animais (Thal et al., 1995; Lebreton et al., 2014).

No estudo de Ryu et al. (2013) foram estimadas as espécies enterocócicas provenientes de amostras de água de locais da costa da Califórnia, Carolina do Norte e Porto Rico (n=311) que tenham sido supostamente impactadas por material fecal de gaivotas, bovinos, humanos e outros animais selvagens, e ainda de amostras fecais (n=497) de 4 espécies de animais domesticados (ex. caprino, equino, suíno), 13 espécies de animais selvagens (ex. coelho, raposa, veado, esquilo) e 7 espécies de aves (ex. pato,

frango, gaivota, pelicano, cisne, peru). Destes, os 439 isolados de enterococos obtidos estavam distribuídos entre *E. casseliflavus* (34%), *E. faecalis* (25%), *E. mundtii* (15%), *E. faecium* (5%) e *E. hirae* (5%). Todas essas espécies foram também encontradas no trato gastrointestinal dos lobos-marinhos do litoral do Rio Grande do Sul, evidenciando a ampla distribuição do gênero no ambiente marinho e em diferentes animais e localizações geográficas.

Mote et al. (2012) constataram que as espécies de enterococos predominantes na água foram *E. faecalis* (31%), *E. mundtii* (31%), *E. casseliflavus* (16%), *E. faecium* (10%), *E. flavescens* (8%) e *E. gallinarum* (4%). Neste mesmo estudo, em amostras de plâncton associado, a prevalência de 35% de *E. faecalis*, 29% de *E. casseliflavus*, 24% de *E. mundtii* e 12% de *E. faecium* foram observadas. Bennani et al. (2012) determinaram a composição de enterococos isolados de amostras de água do mar, mariscos e sedimentos de três regiões com diferenças geográficas, populacionais e ecológicas da costa mediterrânea do Marrocos, e detectaram as espécies prevalentes dependendo do ponto e da amostra analisados. Através de testes bioquímicos, dos 370 enterococos isolados, 92,16% foram identificados em nível de espécie, dos quais *E. faecium* foi a mais frequente, seguida por *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. gallinarum*.

Similar à maioria dos seres humanos, os lobos-marinhos parecem apresentar *E. faecalis* como espécie predominante do trato gastrointestinal. Este resultado não surpreende pois, embora *E. faecalis* e *E. faecium* sejam os enterococos predominantes em fezes humanas e de esgoto (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009), estas espécies também estão presentes nas fezes de

animais não-humanos (Devriese et al., 1987), incluindo a vida selvagem (Mundt, 1963). Nas amostras de leite materno investigadas por Jiménez et al. (2013), 120 isolados foram identificados em nível de espécie como *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* ou *E. durans*. Entre eles, *E. faecalis* foram as mais abundantes e foi a única espécie presentes em todas as amostras de mamíferos incluídas no estudo. Quanto à espécie *E. faecium*, apesar da rara detecção nas fezes de lobos-marinhos, também foi esporádica no estudo de Ryu et al. (2013), que encontraram um baixo índice entre os 439 isolados ambientais avaliados, sendo que somente 5 foram classificados como sendo dessa espécie.

Enterococcus hirae, a segunda espécie prevalente nos lobos-marinhos, foi também detectada na maioria das amostras de leões-marinhos do estudo de Layton et al. (2010), apesar de não ser uma das mais frequentes. Nesta investigação, os autores encontraram as espécies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. gallinarum* em amostras de fezes de focas. Em relação à distribuição entre as amostras, *E. faecalis* esteve presente em todas as amostras testadas, enquanto *E. hirae* não foi detectado nestes animais. Já nas amostras de leões-marinhos a espécie prevalente também foi *E. faecalis*, detectada em 75% das amostras, seguida de *E. durans* (63%), além de *E. avium*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. hirae*. Além disso, o fato de todas as espécies constatadas em focas e leões-marinhos também serem identificadas nas amostras de esgoto avaliadas remete à possibilidade de haver um fluxo microbiano entre os nichos.

Na pesquisa de Layton et al. (2010), a presença de *E. casseliflavus* nas amostras de fezes foi associada à dieta, uma vez que esta espécie é considerada epífita, podendo ser incorporada à microbiota do trato gastrointestinal após consumo. Fisher & Phillips (2009) apontam que além de *E. casseliflavus*, a espécie *E. mundtii* também é rotineiramente isolada de fontes vegetais. Nos lobos-marinhos, o isolado *E. mundtii* foi encontrado na mesma amostra em que prevaleceu a colonização por *E. casseliflavus*. Este resultado pode indicar algum comportamento peculiar do animal (*J. A. australis*) em relação à alimentação, desencadeando o predomínio dessas espécies.

Enterococcus gallinarum foi observada em baixa frequência nos lobos-marinhos. Estes dados corroboram com os demonstrados nas amostras de fezes de focas e leões-marinhos avaliadas por Layton et al. (2010), bem como nos estudos de Mote et al. (2012) e Bennani et al. (2012).

As diferenças observadas entre as frequências das espécies podem estar relacionadas às metodologias associadas, uma vez que técnicas baseadas no cultivo dos micro-organismos são comumente utilizadas na detecção de enterococos ambientais, correndo-se o risco de suprimir algumas espécies (Ryu et al., 2013). Estes estudos demonstram que várias das espécies de enterococos detectadas em um mesmo tipo de amostra podem apresentar variações relativas à prevalência devido a uma série de fatores.

À exemplo, em estudo realizado com águas de 120 balneários na Grécia, foram detectadas dez espécies de enterococos, das quais *E. avium* (27,2%) e *E. raffinosus* (23,4%), que ocorrem em altas densidades em fezes de

animais de sangue quente como aves marinhas e mamíferos, e ainda *E. faecium* (19,9%), foram as mais prevalentes entre os 316 isolados de enterococos avaliados no estudo. Em menor frequência, foram identificadas as espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. pseudoavium* e *E. durans*; e esporadicamente *E. malodoratus*, *E. hirae* e *E. gallinarum* (Arvanitidou et al., 2001). Este trabalho foi o que apresentou composição mais discrepante em comparação aos outros estudos relacionados aqui. Isso pode estar associado a alguma peculiaridade local, que levou à prevalência de espécies que nem mesmo foram detectadas nas demais averiguações.

No seu conjunto, estes dados sugerem que algumas espécies parecem ser componentes naturais de ambientes marinhos, seja da água, de sedimentos, ou mesmo de animais. Contrastes na ocorrência de espécies de enterococos podem estar relacionados com diferenças nas taxas de crescimento *in situ* e sobrevivência ambiental, ou ainda com a distribuição preferencial das espécies em animais distintos, sugerindo que as espécies ambientalmente relevantes encontram-se em uma grande variedade de hospedeiros (Ryu et al., 2013).

Nas amostras de lobos-marinhos, a utilização da técnica de PCR Multiplex utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para as espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* permitiu a identificação de 103 isolados. Esta técnica tem se mostrado uma ferramenta molecular simples e que permite a identificação rápida e precisa de enterococos (Castillo-Rojas et al., 2013). Layton et al. (2010) também utilizaram o PCR Multiplex para rastrear *Enterococcus* spp. arranjando os

oligonucleotídeos em diferentes grupos com a possibilidade de, em um mesmo PCR, confirmar o gênero e identificar até duas espécies distintas. Além disso, foi avaliada a capacidade da técnica para identificar as espécies em culturas mistas, sendo esta menos eficiente do que de culturas puras por indicar falsos-negativos.

Para os lobos-marinhos, dos 57 isolados negativos para a PCR Multiplex submetidos aos testes bioquímicos convencionais, somente 8 perfis típicos foram identificados, sendo necessária a utilização de métodos complementares, como o sequenciamento da região 16S rRNA, para concluir a etapa de identificação. Um dos isolados (J14), identificado por testes bioquímicos e sequenciamento como *E. casseliflavus*, mas com resultado negativo no PCR Multiplex contendo oligonucleotídeo espécie-específico para esta espécie, provavelmente não tenha sido detectado pelo PCR por mutação na região de anelamento do oligonucleotídeo, impedindo que o fragmento fosse amplificado e detectado em gel de agarose.

5.3 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Enterococos resistentes a antimicrobianos em reservatórios não humanos são cada vez mais frequentes na medida em que são realizados estudos nessa direção, e a contribuição destes agentes para a disseminação da resistência ainda são debatidos (Turnidge, 2004; Lebreton et al., 2014). Bennani et al. (2012) destacam para a escassez de estudos sobre resistência antimicrobiana em águas marinhas, sendo que este ambiente recebe, indevidamente, resíduos de todos os tipos. Além disso, confirma que o uso terapêutico de antimicrobianos em seres humanos, assim como para controle

de infecções e promoção de crescimento de animais, pode selecionar genes resistentes e levar ao aparecimento de estirpes que expressem tais características nos mais distintos ambientes.

A contaminação das águas costeiras ocorre a partir de diversas fontes que podem transportar micro-organismos resistentes a antimicrobianos para áreas onde eles são considerados alóctones, como os oceanos (Stewart et al., 2014; Lebreton et al., 2014). Os oceanos acabam sendo o destino de muitos micro-organismos patogênicos e as infecções que ocorrem em mamíferos marinhos costumam evoluir para óbito, conforme aponta Bogomolni et al. (2008), que identificaram doenças infecciosas como o mais significativo fator de mortalidade em vertebrados marinhos (31% das mortes). Neste estudo, ficou demonstrada a influência geográfica na ocorrência dos organismos nocivos pesquisados, como *Brucella*, *Leptospira*, *Giardia* e *Cryptosporidium*, em aves, tubarões e mamíferos marinhos (focas, baleias e golfinhos).

De acordo com Stewart et al. (2014), as semelhanças fisiológicas entre seres humanos e mamíferos marinhos seriam um incentivo à pesquisa sobre patógenos que colonizam estes animais na natureza e o potencial zoonótico de patógenos específicos. Sobretudo, os autores reforçam ainda que as publicações sobre bactérias aeróbicas nestes animais são imprescindíveis para estabelecer dados de referência sobre as espécies que os colonizam, através da identificação e investigação de suas características, reconhecendo que a saúde das pessoas, animais e meio ambiente são indissociáveis.

A pesquisa de Stewart et al. (2014) buscou identificar e avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das espécies de bactérias associadas a

golfinhos da espécie *Tursiops truncatus*. Amostras coletadas de fezes e *swabs* do espiráculo destes mamíferos durante as operações de captura/soltura em diferentes áreas ao longo da costa do Atlântico dos EUA (sudeste) e do Golfo do México no decorrer de 6 anos, possibilitou detectar um elevado índice de bactérias resistentes. Entre os 123 golfinhos amostrados, 74% apresentaram bactérias resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 48% abrigavam bactérias resistentes a mais de um antimicrobiano. Dentre os 656 isolados bacterianos testados, quase metade (48,5%) foi resistente a pelo menos um antimicrobiano, enquanto que 51,5% foram sensíveis ou intermediários a todos os antimicrobianos testados.

A resistência generalizada evidenciada por Stewart et al. (2014) sugere que esta propriedade ocorra ao longo das águas costeiras, não sendo o resultado da utilização terapêutica de antibióticos, uma vez que todas as amostras foram coletadas de animais silvestres. Além disso, demonstra que a resistência pode ser transmitida entre os micro-organismos e que a aquisição e manutenção de propriedades de resistência possam ocorrer em resposta a outros fatores de *stress* (Stewart et al., 2014). Este estudo, assim como outros realizados com mamíferos marinhos (Johnson et al., 1998; Bogomolni et al., 2008; Rose et al., 2009), é consistente com a observação de resistência aqui reportada para lobos-marinhos, e ascendem à discussão de que as características de resistência podem surgir a partir de ambientes marinhos, visto que estes animais silvestres não teriam entrado em contato (direto) com compostos antimicrobianos.

Rose et al. (2009) relataram que 58% dos isolados bacterianos de 472 vertebrados ao longo da costa nordeste dos EUA eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, e que 43% eram resistentes a mais de um antimicrobiano. Maior incidência de resistência foi relatada em aves marinhas do que em mamíferos marinhos, e por animais encalhados ou capturados do que por animais vivos.

A investigação de Johnson et al. (1998), realizada com pinípedes vivos transportados para um centro de reabilitação na Califórnia, obteve 255 isolados bacterianos de 19 gêneros durante um período de dois anos (1994-1995). Destes, 129 isolados obtidos de 15 leões-marinhos (*Zalophus californianus*), 19 elefantes-marinhos (*Mirounga angustirostris*) e 33 focas (*Phoca vitulina*) foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana. As coletas eram realizadas preferencialmente em até três dias após a entrada do animal no centro de reabilitação, a fim de detectar micro-organismos provenientes de infecções já estabelecidas no ambiente marinho e evitar interferentes secundários. O isolamento demonstrou que 72% das bactérias eram Gram-negativas, sendo que destas, 75% eram da família Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp.). Os isolados Gram-positivos foram identificados como *Enterococcus* spp. ou *Staphylococcus aureus*. Os autores relataram múltipla resistência entre os isolados bacterianos testados, e entre os enterococos, a suscetibilidade observada foi: 73% para ampicilina, 20% para cloranfenicol, 63% para ciprofloxacina, 33% para gentamicina e 13% para tetraciclina.

No presente estudo, dentre os 160 enterococos obtidos dos lobos-marinhos, 58,13% foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Todos os isolados foram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina e vancomicina. Poeta et al. (2005) demonstraram, entre os enterococos isolados de animais selvagens, que 31,4% eram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados e não observaram cepas resistentes à ampicilina. Arvanitidou et al. (2001) também não encontraram enterococos com resistência à ampicilina nas amostras de água marinha da costa da Grécia. Da mesma forma, Castillo-Rojas et al. (2013) não encontraram resistência nos *E. faecalis* de amostras de água avaliadas. Apesar destes resultados, Lebreton et al. (2014) reforçam a existência de muitos enterococos oriundos de animais que são frequentemente resistentes a penicilina ou ampicilina.

Assim como em lobos-marinhos, Poeta et al. (2005) não observaram perfis de resistência frente ao cloranfenicol em enterococos isolados de animais selvagens. Os poucos relatos sobre a ocorrência de resistência ao cloranfenicol entre enterococos isolados de animais podem estar relacionados à restrição de uso do cloranfenicol, que foi banido na produção de alimentos de origem animal por mais de 30 anos e é utilizado com cautela na medicina humana (Lebreton et al., 2014). Apesar disso, Johnson et al. (1998) encontraram enterococos com resistência ao cloranfenicol em pinípedes.

Quanto aos enterococos resistentes à estreptomicina, Castillo-Rojas et al. (2013) também não encontraram perfil de resistência nos *E. faecalis* das amostras de água avaliadas. De maneira geral, outros estudos encontraram baixas frequências de resistência para este composto. Arvanitidou et al. (2001)

encontraram 9,81% (31/316) dos enterococos resistentes nas amostras de água marinha da costa da Grécia. Poeta et al. (2005) encontraram 1,4% (de 140 isolados) dos enterococos de animais selvagens com resistência à estreptomicina. Em contraponto, Jiménez et al. (2013) verificaram que todos os *E. faecalis* e a maioria dos *E. faecium* apresentaram resistência frente à estreptomicina, enquanto nenhum *E. hirae* ou *E. casseliflavus* apresentou esta característica nas amostras de leite materno. Thal et al. (1995) e Lebreton et al. (2014) apontam que estes perfis têm sido observados entre animais criados em maior proximidade a humanos.

No presente estudo não foram detectados isolados resistentes à gentamicina. Estes resultados corroboram com os observados por Arvanitidou et al. (2001), que também não encontraram enterococos resistentes nas amostras de água marinha, sugerindo que esta seja uma característica rara neste ambiente. No entanto, no estudo de Castillo-Rojas et al. (2013), apesar de a maioria dos *E. faecalis* das amostras de água avaliadas terem sido sensíveis, a investigação encontrou resistência em 2,8% dos isolados. Jiménez et al. (2013) observaram características de resistência somente em alguns *E. faecalis*, mas em nenhum *E. faecium*, *E. hirae* ou *E. casseliflavus* nas amostras de leite materno. Poeta et al. (2005) encontraram 1,4% (entre 140 isolados) dos enterococos de animais selvagens com resistência à gentamicina.

Estes resultados, juntamente com a não observância de estirpes resistentes nos lobos-marinhos, sugerem que, apesar de uma variedade de animais apresentarem resistência aos aminoglicosídeos em altos níveis

(Lebreton et al., 2014), por ser uma análise em concentrações baseadas no uso para tratamento humano, é provável que a aquisição desse fenótipo em ambientes mais afastados ainda seja pouco frequente e influenciada por outros fatores. Mesmo não sendo detectada nas concentrações testadas, a resistência intrínseca dos enterococos é um fator que pode levar à evolução para uma resistência mais acentuada, sendo interessante a caracterização através de concentrações mínimas inibitórias.

Quanto à presença de cepas resistentes à vancomicina, muitos estudos descrevem a ocorrência de enterococos vancomicina resistentes (VRE) em animais, alimentos e seres humanos (Lebreton et al., 2014), entretanto, não foram observados VRE nas amostras de fezes de lobos-marinhos. Outros estudos também não observaram VRE em amostras de água marinha (Arvanitidou et al., 2001), de leite materno de diferentes mamíferos (Jiménez et al., 2013) e de animais selvagens (Poeta et al., 2005). Mesmo Castillo-Rojas et al. (2013) observaram um percentual baixo, onde 94,4% dos *E. faecalis* isolados de amostras de água eram sensíveis a este antimicrobiano.

As propriedades de resistência dos enterococos isolados das amostras fecais de lobos-marinhos foram mais frequentemente encontradas, respectivamente, para eritromicina, nitrofurantoína, tetraciclina, norfloxacina e ciprofloxacina. Bennani et al. (2012), ao avaliarem o perfil de resistência dos enterococos isolados de amostras de água do mar, mariscos e sedimentos, observaram que 54,4% eram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados (ampicilina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina). Destes, nenhum foi considerado efetivo contra

todas as cepas, ou seja, algum dos enterococos testados foi resistente frente ao composto. Além disso, eritromicina, rifampicina e tetraciclina foram os que apresentaram mais isolados com perfil resistente.

Arvanitidou et al. (2001) encontraram, entre os 316 enterococos avaliados, 87,3% das cepas resistentes a um ou mais antimicrobianos. Os resultados deste estudo sugerem que águas de balneários podem contribuir para a disseminação de espécies de enterococos com perfis de resistência a muitos antimicrobianos utilizados para tratar infecções. Nesta investigação, assim como para os lobos-marinhos, a resistência à eritromicina foi a mais observada (57,3%). O alto percentual de enterococos resistentes à eritromicina em ambientes costeiros tem particular interesse uma vez que macrolídeos são frequentemente usados no tratamento de infecções enterocócicas, principalmente quando há casos de alergia à penicilina. Para este antimicrobiano, Jiménez et al. (2013) observaram características de resistência em *E. faecalis*, *E. hirae* e *E. faecium*, mas não em *E. casseliflavus* nas amostras de leite materno, e também Poeta et al. (2005) encontraram 20,1% entre seus 140 isolados de animais selvagens com resistência.

Cepas resistentes à nitrofurantoína foram observadas em 16 isolados nos lobos-marinhos. Castillo-Rojas et al. (2013) também observaram baixa frequência de enterococos resistentes a este antimicrobiano (2,8%) nas amostras de água avaliadas. Quanto à frequência de cepas resistentes à tetraciclina, os níveis observados por Castillo-Rojas et al. (2013) foram quatro vezes maiores do que os detectados nas amostras de lobos-marinhos, com 25% do *E. faecalis* de amostras de água avaliadas com resistência a este

antimicrobiano. Poeta et al. (2005) encontraram 28,6% de seus isolados de enterococos de animais selvagens com resistência à tetraciclina.

Os menores percentuais de resistência dos enterococos isolados de fezes de lobos-marinhos foram detectados para norfloxacin e ciprofloxacina, com 5 enterococos resistentes cada. Para ciprofloxacina, Arvanitidou et al. (2001) encontraram 15,5% entre os 316 enterococos das amostras de água marinha com resistência, e Poeta et al. (2005) 8,6% entre os 140 isolados de enterococos de animais selvagens com resistência a este composto.

Para norfloxacin a verificação em lobos-marinhos foi realizada pois, apesar de não haver dados na literatura avaliando este antimicrobiano em animais selvagens, costuma ser detectado em fezes humanas (Edlund et al, 1988) e enterococos de leite bovino e bubalino (Fracalanza et al., 2007; Prichula et al., 2013).

Das oito amostras fecais de lobos-marinhos submetidas aos testes de suscetibilidade, somente uma delas não apresentou micro-organismos com resistência aos antimicrobianos avaliados. Considerando o número de isolados de cada espécie com algum nível de resistência, distribuídos nas oito amostras estudadas, verificou-se que todos os *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecium* foram resistentes a um ou mais antimicrobianos. Entre os *E. hirae*, 45,45% foram resistentes, e nos *E. faecalis*, 23,46% apresentaram algum tipo de resistência. *Enterococcus faecium* foi o único considerado multirresistente por apresentar resistência frente a três antimicrobianos de classes distintas (macrolídeos, quinolonas e nitrofurânicos). Segundo Wright (2007), o fenótipo de resistência combinada tem sido encontrado naturalmente em isolados

ambientais, portanto, patógenos multirresistentes devem emergir com cada vez mais frequência. Por outro lado, o único isolado *E. mundtii* não apresentou qualquer resistência contra nenhum dos antibiogramas testados.

Os resultados observados no presente estudo e nos demais relatados aqui demonstram a colonização de diferentes nichos oceânicos por bactérias oportunistas rotineiramente associadas a doenças humanas, embora isso não signifique que estes isolados possam causar doenças (Stewart et al., 2014). Os baixos percentuais de resistência detectados em nossa análise em relação aos referidos por outros autores para enterococos fecais de seres humanos ou outros animais e do ambiente pode ser associado à exposição direta de alguns destes grupos aos fármacos, ou mesmo indiretamente através da cadeia alimentar e outras fontes contaminadas. Nesse sentido, os nossos resultados corroboram, assim como Poeta et al. (2005), com a ampla utilização de antibióticos na medicina humana e veterinária e as diferenças encontradas em um ecossistema com níveis consideravelmente reduzidos destes compostos, como os de animais silvestres, em que os baixos percentuais de resistência a antibióticos foram detectados.

A transmissão de patógenos de ambientes marinhos é geralmente associada ao consumo de água contaminada, mariscos e peixes, ou através do contato com a água do mar. No entanto, embora as exposições associadas a mamíferos marinhos não sejam tão bem estudadas, existe um potencial para o fluxo de agentes patogênicos com seres humanos através da exposição de trabalhadores (veterinários e pesquisadores) ou caçadores, que podem ter contato direto com esses animais (Moore et al., 2008; Stewart et al., 2014).

Castillo-Rojas et al. (2013), ao comparar o perfil de resistência de linhagens clínicas e de água, destacam que a água representa uma via potencial de transmissão para a comunidade e uma fonte de genes de resistência a antimicrobianos que podem ser facilmente transmitidos para outras espécies bacterianas. Diante disso, sendo o meio aquático um potencial reservatório e transmissor de micro-organismos dotados das mais diversas características para a comunidade humana, este constitui-se também de uma via com potencial risco para os demais animais. Por outro lado, garante a heterogeneidade microbiana nos mais diversos nichos e a permanência de linhagens que podem contribuir para o equilíbrio dos ecossistemas.

A resistência antimicrobiana pode ter origens ambientais e ser transmitida sem a pressão seletiva do uso destes compostos, podendo representar a resistência intrínseca de algumas das espécies e desempenhar um papel funcional, como produtores de antimicrobianos (Stewart et al., 2014). Entretanto, o nível de resistência de bactérias comensais é considerado um bom indicador para pressão de seleção pelo uso de antimicrobianos. Em todo o mundo, a preocupação com o aumento da prevalência de resistência a antimicrobianos impulsiona as pesquisas na área clínica, como se outros reservatórios não pudessem contribuir para o desenvolvimento de linhagens resistentes. À vista disso, o potencial emergente de patógenos e organismos resistentes nos sistemas marinhos exige estudos mais aprofundados e o monitoramento de bactérias indicadoras fecais torna viável a comparação da prevalência de resistência e a detecção da transferência de bactérias

resistentes ou de genes de resistência de animais para humanos e vice-versa (Van Den Bogaard & Stobberingh, 2000; Stewart et al., 2014).

Na revisão feita por Van Den Bogaard & Stobberingh (2000) sobre a epidemiologia de resistência antimicrobiana entre humanos e outros animais, fica exposta a transferência de alguns destes elementos entre as espécies, e mesmo organismos saudáveis atuam como reservatórios e disseminadores destes micro-organismos. Enterococos com perfil de resistência são amplamente descritos em alimentos e a aquisição de estirpes via cadeia alimentar merece vigilância. Giraffa et al. (2002) destacaram o papel desempenhado pelos reservatórios alimentares na divulgação das características de resistência no meio ambiente, e muitas das espécies comumente detectadas já foram encontradas em ambientes hospitalares e extra-hospitalares (Lebreton et al., 2014), assim como nos estudos aqui descritos em ambientes marinhos.

No caso dos animais avaliados no presente estudo, que não receberam qualquer tipo de tratamento medicamentoso, a presença de linhagens enterocócicas com traços de resistência pode ser atribuída ao resistoma antimicrobiano, caracterizado por ser a coleção de todos os elementos de resistência precursores encontrados em bactérias patogênicas e não patogênicas, e genes de resistência presentes em cromossomos e que não necessariamente sejam expressos (Wright, 2007; Stewart et al., 2014).

Ao longo dos milênios os micro-organismos desenvolveram estratégias para superar os desafios químicos e ambientais e, mesmo antes do primeiro uso medicinal de antibióticos, micro-organismos resistentes já haviam

sido isolados fora do círculo clínico. A maior parte dos produtos químicos produzidos por micro-organismos não são citotóxicos e, mesmo aqueles que são tóxicos, requerem concentrações que podem exceder os níveis encontrados no ambiente natural. Portanto, organismos que evoluíram sob uma pressão constante de complexidade química são provavelmente a fonte de muitos genes de resistência a antimicrobianos, compreendendo a maior parte do resistoma (Wright, 2007).

Micro-organismos, plantas e animais estão continuamente expandindo a diversidade química de moléculas, assim como os seres humanos, que também desenvolvem novos suportes químicos frente a antimicrobianos, configurando um processo contemporâneo e permanente. Desta maneira, a produção de metabólitos secundários, como antimicrobianos, pode também estimular mecanismos de autoproteção a partir da atividade tóxica dessas moléculas, tornando estes organismos pontos críticos para a evolução da resistência. Do mesmo modo, micro-organismos em nichos específicos devem coevoluir copiando estratégias para competir por recursos, por exemplo, pela transferência horizontal de genes de resistência a partir de outras espécies bacterianas. Logo, o fato de muitas bactérias ambientais serem intrinsecamente resistentes a determinadas drogas sugere que os mecanismos de resistência em isolados clínicos possam ter origem no resistoma ambiental. Isto expõe a falta de compreensão sobre a evolução dos mecanismos de resistência bacteriana e aponta novos paradigmas a serem expandidos para diminuir o impacto da resistência no futuro (Wright, 2007).

5.4 Presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)* relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina

Além da propagação de estirpes resistentes, a transferência de genes relacionados atravessam barreiras de espécie, gênero e reino devido às trocas de informações genéticas (Van Den Bogaard & Stobberingh, 2000; Wright, 2007). Além disso, a capacidade bacteriana de replicação rápida somada à facilidade de transferência genética e à pressão seletiva do uso de antimicrobianos torna o fenômeno da resistência praticamente inevitável. Estima-se ainda que alguns antimicrobianos, como eritromicina, estreptomicina e vancomicina biossintética, tenham surgido ao longo de 880, 610 e 240 milhões de anos atrás, respectivamente. Para β -lactamases, a estimativa é de que tenha surgido a cerca de 2 bilhões de anos atrás. Diante disso, é vital que o uso destes compostos e o levantamento da existência de bactérias como reservatórios de uma série de genes de resistência altamente eficientes circulando no resistoma ambiental seja revisto (Wright, 2007).

A resistência à tetraciclina costuma ser mediada por dois grupos maiores de genes, o primeiro inclui os genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* que codificam proteínas de proteção ribossomal, e o segundo é representado pelos genes *tet(L)* e *tet(K)* que codificam proteínas de bombas de efluxo de tetraciclina (Poeta et al., 2005; Cassenego et al., 2011). Genes que codificam as proteínas de efluxo são comuns a todos os genomas bacterianos. As bombas de efluxo proporcionam a máxima flexibilidade para o organismo de modo que ele possa explorar diversos ambientes, promover a patogenicidade e modular a diferenciação celular, como a formação de biofilme (Wright, 2007).

Nos lobos-marinhos, a presença dos genes *tet(L)* e *tet(M)* avaliadas nos 10 *E. hirae* resistentes à tetraciclina evidenciou 3 isolados com o gene *tet(M)*, enquanto nenhum apresentou o gene *tet(L)*. A baixa detecção dos genes que costumam ser relatados como as principais estratégias de resistência em isolados clínicos sugere a existência de uma tática diferente por parte destes micro-organismos. No entanto, a avaliação foi realizada somente nos micro-organismos de uma mesma amostra que expressaram fenotipicamente a resistência, indicando que este resultado pode ser particular.

Da mesma maneira, o gene *erm(B)*, frequentemente assinalado como mecanismo de resistência à eritromicina, teve baixo índice entre os enterococos de lobos-marinhos avaliados (5,9%). Um dos mecanismos mais comuns de resistência aos macrolídeos é mediado pela metilação de um resíduo de adenina específica do 23S rRNA e está associado com o gene *erm(B)* (Poeta et al., 2005). Este gene costuma ser observado em enterococos de origem animal e as evidências de disseminação foram demonstradas em *Enterococcus* spp. isolados a partir de *swabs* clocais de frangos (Cassenego et al., 2011).

Diferentemente dos resultados encontrados para os lobos-marinhos, Poeta et al. (2005), avaliando isolados de enterococos de material fecal de aves, mamíferos e outros animais selvagens de Portugal, verificaram o gene *tet(M)* em todos os isolados resistentes à tetraciclina, independentemente da espécie de enterococos ou do animal de origem, e na maioria dos casos também estava presente o gene *tet(L)*. Além disso, todos os enterococos resistentes à eritromicina abrigavam o gene *erm(B)*.

Há evidências de que muitos micro-organismos não patogênicos possuem genes relacionados à resistência antimicrobiana. Entre os elementos incluídos no resistoma, estão todos os genes de resistência crípticos, que não necessariamente são expressos. O resistoma também compreende os genes precursores que codificam as proteínas com atividade de resistência moderada, que podem evoluir para genes de resistência efetiva, destacando a importância de pesquisas para o entendimento de mecanismos de resistência (Wright, 2007).

Em conclusão, apesar dos fenótipos de resistências, os níveis relativamente baixos de genes associados nos enterococos de lobos-marinhos sugerem que estes animais podem adotar estratégias diferentes das comumente utilizadas por enterococos de origem humana e outros animais.

5.5 Distribuição dos fatores de virulência entre os enterococos

Bactérias que colonizam o trato gastrointestinal interagem em associações complexas e em grande parte são estudadas em conjunto com outras bactérias. À exceção dos enterococos em abundância relativa nas fezes humanas, pouco é conhecido sobre a natureza dos enterococos que colonizam este ecossistema e sobre fatores que influenciam a seleção de espécies específicas (Mundy et al., 2000).

Os mecanismos moleculares de virulência no gênero *Enterococcus* ainda não foram completamente compreendidos, mas a ampla capacidade de transferência genética e os diferentes mecanismos que permitem a eles carrear esses determinantes podem contribuir para o aumento da virulência (Poeta et

al., 2005). A descrição de trabalhos como o de Eaton & Gasson (2001), sobre a transferência de determinantes de virulência, justificam a preocupação referente à presença de genes de virulência em isolados ambientais. Estes autores encontraram genes relacionados à virulência em cepas enterocócicas utilizadas como culturas *starter* em alimentos, o que sugere que o fato de estes genes estarem presentes não necessariamente indique risco ou certeza de que ocorrerá alguma enfermidade. Ainda assim, os fatores de virulência de cepas relacionadas a infecções hospitalares e alimentos costumam ser bastante estudados, principalmente em linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium*.

A ampla distribuição de genes de virulência e/ou resistência a antimicrobianos entre cepas destas espécies isoladas de leite materno por Jiménez et al. (2013) indica que eles podem constituir um reservatório de tais características para o intestino da prole e, como consequência, um risco potencial para outros animais. Apesar do grande número de genes que codificam fatores de virulência ser observado em *E. faecalis* e não em outras espécies de enterococos isoladas a partir de amostras de animais selvagens, como avaliado por Poeta et al. (2005), mais estudos devem ser realizados para avaliar a evolução de enterococos abrigando determinantes de virulência em diferentes ecossistemas. No ambiente marinho, Stewart et al. (2014) relatam que no gênero *Vibrio* spp., prevalente entre as amostras de golfinhos por eles demonstradas, foram descritas muitas cepas comprovadamente virulentas.

Em nosso estudo, todos os genes de virulência avaliados foram mais frequentemente estabelecidos em isolados de *E. faecalis* em comparação com as outras espécies, à exceção do gene *asa*, que teve um percentual maior em

E. hirae, considerando o número de isolados de cada espécie. Porém, o número de algumas espécies não foi significativo para uma comparação completa e segura. Mesmo assim, a maior incidência de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* pode indicar seu maior potencial patogênico quando comparado as outras espécies de *Enterococcus* spp., visto que estão mais amplamente relacionados com infecções do que as demais espécies do gênero.

Entre os 160 isolados de enterococos obtidos dos lobos-marinhos, 69,4% apresentaram pelo menos um dos genes testados, sendo a maior incidência observada para os genes *ace* e *gelE*, e menor incidência para *asa* e *cylA*. A prevalência do gene *ace* pode ser atribuída a algum aspecto particular dos lobos-marinhos, pois Poeta et al. (2005), ao detectar genes codificadores de determinantes de virulência em enterococos fecais de animais selvagens, observou prevalência distinta. Neste estudo, a distribuição dos genes entre os 73 *E. faecalis* ficou assim estabelecida: 9,6% *ace*, 75,3% *gelE* e 30,1% *agg*, e somente um *E. faecalis* isolado de fezes de coelho foi considerado livre dos fatores de virulência testados. Além destes, dois *E. faecium* apresentaram *gelE*, e no restante dos isolados identificados (65) no estudo não foi possível detectar estes genes (Poeta et al., 2005).

Em relação às amostras de lobos-marinhos analisadas, a que apresentou menor número de isolados com o gene *ace* foi a **G**, composta exclusivamente por *E. hirae*. Em três amostras (**B**, **D** e **E**) todos os isolados apresentaram o gene *ace*. O percentual de espécies que apresentaram o gene, considerando o total de cada espécie, destacou maior incidência do gene com

93,8% dos *E. faecalis*, seguido por 63,2% dos *E. casseliflavus*, 33,3% dos *E. gallinarum* e 32,7% dos *E. hirae*. Os isolados *E. mundtii* e *E. faecium* não apresentaram o gene *ace*.

O gene *ace* codifica uma proteína de superfície específica de *E. faecalis* caracterizada por mediar a ligação do micro-organismo a proteínas da matriz extracelular (Nallapareddy et al., 2000). Alguns modelos animais parecem associar a presença do gene *ace* com infecções causadas por *E. faecalis* (Koch et al., 2004), entretanto, a função de *ace* em enterococos provenientes de outras fontes não foi ainda esclarecida e poucos avanços foram realizados a fim de explicar seu papel em isolados ambientais, ficando assim demonstrada a grande disseminação deste gene entre as amostras de lobos-marinhos.

O gene *gelE* esteve presente em pelo menos dois isolados de cada amostra avaliada, ou em sua totalidade (amostras **D** e **E**). Em relação às espécies ponderadas, 100% dos *E. mundtii* apresentaram o gene *gelE*, seguido por 76,5% dos *E. faecalis*, 33,3% dos *E. gallinarum*, 26,3% dos *E. casseliflavus* e 21,8% dos *E. hirae*; o isolado *E. faecium* não apresentou o gene. Entretanto, em virtude do maior número amostrado, considerou-se como mais expressiva a presença deste gene nos isolados *E. faecalis* que, assim como Poeta et al. (2005), apresentaram percentual similar entre os isolados de mesma espécie identificados em animais selvagens: 75,3%.

Quando expressa, a gelatinase é capaz de clivar vários substratos, favorecendo o desenvolvimento do biofilme. Porém, a presença do gene da gelatinase por si só não é capaz de assegurar a sua expressão (Camargo et al., 2008). A expressão do gene do fator de virulência pode ser controlada por

uma regulação muito complexa que não é o foco deste estudo. Embora essa característica não seja determinante para a patogênese (Poeta et al., 2005), a proporção de isolados com *geE* (50,62%) e a distribuição entre as amostras, aliada à descrição de muitos isolados envolvidos em infecções que apresentavam este gene (Fisher & Phillips, 2009; Golińska et al., 2013), indicam uma relativa capacidade de virulência de cepas de lobos-marinhos, assim como constatado por Poeta et al. (2005) em outros animais selvagens.

A elevada incidência dos genes *geE* e *ace* em enterococos isolados de amostras ambientais demonstra que estas estirpes podem abrigar genes de virulência em grandes proporções e, somada à propensão dos enterococos em transferir determinantes de virulência, devem ser prudentemente analisados, pois a transferência à microbiota endógena através de conjugação é facilitada (Fisher & Phillips, 2009).

Referente à distribuição entre as amostras, o *asa* foi detectado em seis das oito amostras avaliadas, variando de um a seis o número de enterococos por amostra contendo o gene. As amostras que não tiveram isolados com este gene foram a **L** e a **G**. Em relação à distribuição entre as espécies, este gene esteve presente em baixas proporções em três das seis espécies identificadas: 16,4% em *E. hirae*, 11,1% em *E. faecalis* e 5,3% em *E. casseliflavus*.

As substâncias de agregação são proteínas de superfície importantes no processo de conjugação bacteriana por mediar a aderência a uma variedade de superfícies de células eucarióticas e são bastante estudadas em linhagens de *E. faecalis* (Mundy et al., 2000; Poeta et al., 2005; Camargo et

al., 2008). No entanto, como mostrado nos isolados de lobos-marinhos, foi possível detectar a presença do gene *asa* em outras espécies, indicando que a conjugação também é favorecida em cepas distintas de *E. faecalis*. Dessa forma, pode-se atribuir a presença do gene em cepas da maioria das amostras como sendo um fator que contribua para melhorar a capacidade de adesão da bactéria a células epiteliais intestinais, podendo também vir a influenciar a virulência bacteriana (Mundy et al., 2000). De acordo com Mundy et al. (2000), a substância de agregação costuma ser expressa nas estirpes mais citolíticas de *E. faecalis*, fatores estes que podem funcionar em sinergia e co-evoluir.

O gene *cyIA* foi detectado em quatro isolados da espécie *E. faecalis*, representando 4,9% do total identificado para esta espécie. Estes quatro isolados também podem ser caracterizados como os únicos, entre os 160 enterococos avaliados, que apresentaram os quatro genes testados relacionados à virulência. Corroborando com a baixa frequência em lobos-marinhos, Jiménez et al. (2013) não detectaram *cyIA* nos *E. faecalis* das amostras de leite materno de caninos, felinos e humanos.

Devido à associação da expressão da citolisina ser um fator vinculado à ocorrência de infecções, a presença do gene *cyIA*, um dos fatores necessários para a síntese da toxina hemolítica que também tem atividade de bacteriocina, foi um dos principais fatores de virulência investigados que poderia indicar o potencial patogênico destas linhagens. A citolisina em enterococos é de interesse porque suas atividades aumentam a virulência dos enterococos em modelos de infecção e, em estudos epidemiológicos, tem sido associada com a mortalidade do paciente. A citolisina é letal para uma ampla

gama de células procariotas e eucariotas, e esta atividade está presente em cepas particularmente virulentas de *E. faecalis*, incluindo estirpes resistentes a múltiplos antimicrobianos, que servem como modelo para testar o poder de desenvolvimento de virulência terapêutica (Coburn & Gilmore, 2003).

Dessa forma, o fato de os quatro enterococos portadores deste gene também possuírem os outros três genes avaliados pode proporcionar a eles melhores condições de se estabelecer neste ecossistema e indicar maior potencial de virulência. Entretanto, a presença do gene pode estar envolvida com a capacidade de autoproteção exercida pela atividade antimicrobiana (bacteriocina) frente a muitas células procarióticas e eucarióticas (Mundy et al., 2000; Coburn & Gilmore, 2003; Camargo et al., 2008).

A presença de genes de virulência em outras espécies, além de *E. faecalis*, não costuma ser muito documentada, principalmente em amostras ambientais. Mannu et al. (2003) apontam que *E. faecium* é uma espécie geralmente livre de fatores de virulência conhecidos, embora existam algumas referências relacionadas a determinantes de virulência ocasionais em isolados desta espécie (Jett et al., 1994; Eaton & Gasson, 2001; Semedo et al., 2003). Coincidindo, nos lobos-marinhos, apesar de somente um *E. faecium* ter sido identificado, esta foi a única espécie em que nenhum dos quatro genes relacionados à virulência foi detectado. Ainda assim, estes genes têm sido encontrados em espécies como *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e outras (Semedo et al., 2003; Poeta et al., 2005), sugerindo que os determinantes de virulência sejam um traço comum no gênero *Enterococcus*.

Sem considerar o gene *cyIA*, foram encontrados quinze enterococos distribuídos entre as amostras que apresentaram os genes *gelE*, *ace* e *asa*, sendo 1 *E. casseliflavus*, 9 *E. faecalis* e 5 *E. hirae*. Isso representa um percentual de 9,38% entre o total de isolados com 75% dos genes testados, bem abaixo do percentual de 38% encontrado por Poeta et al. (2005) para a presença dos genes *gelE*, *agg* e *cpd* (determinante de feromônio). Em contrapartida, os enterococos de lobos-marinhos apresentaram 69,4% com pelo menos um dos genes testados, sugerindo que alguns destes fatores podem estar relacionados com a colonização e persistência dos enterococos no trato gastrointestinal de mamíferos marinhos.

5.6 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina

Enterococos possuem mecanismos de transferência de genes de eficiência elevada. Os genes de virulência são conhecidos por estarem associados com alguns plasmídeos altamente transmissíveis. Assim, existe o risco de que uma estirpe segura que carece de genes para fatores de virulência conhecidos possa adquirir tais genes por conjugação. Entretanto, a presença de um gene não é suficiente para a expressão gênica. Eaton & Gasson (2001) destacaram que a ausência de atividade enzimática, tanto para gelatinase quanto para citolisina, pode ser atribuída aos baixos níveis ou *down regulation* da expressão gênica ou por um produto gênico inativo. Condições ambientais estabelecidas no habitat em questão também influenciam a expressão gênica e fatores temporais como determinantes físico-químicos do trato gastrointestinal, equilíbrio da microbiota e efeitos do sinergismo bacteriano (competição com outros micro-organismos, disponibilidade de nutrientes, etc), podem tornar

genes silenciosos ativos novamente. Além disso, as condições utilizadas para a realização dos testes fenotípicos são diferentes das encontradas na natureza e a perda de atividade em condições laboratoriais pode ser um interferente, assim como demonstrado por Lopes et al. (2006) em isolados de *Enterococcus* spp. congelados.

Entre os 81 isolados de lobos-marinhos em que foi possível detectar o gene *ge/E*, em 27,2% foi detectada a atividade enzimática. Além destes, dois isolados positivos para gelatinase foram negativos para *ge/E*, o que pode representar alguma alteração na sequência a qual o oligonucleotídeo iniciador deveria se ligar, impedindo que houvesse amplificação.

Eaton & Gasson (2001) também descrevem casos em que este gene foi classificado como silencioso, pois foi detectado mas não teve sua expressão observada. Os autores encontraram maior incidência de genes silenciosos nas cepas clínicas do que nas de alimentos e culturas *starter*. Isso provavelmente se deve ao maior potencial patogênico destas cepas, mas a presença de genes aparentemente silenciosos em alimentos e culturas *starter* é relevante para o seu uso seguro. Da mesma forma, a presença de genes de virulência em amostras ambientais não necessariamente deve ser vista como maior risco à saúde do hospedeiro, mas sim como um aumento na capacidade destes micro-organismos em se instalar no ambiente em questão e se propagar para outros nichos, podendo, sob pressão seletiva, vir a expressar fatores que causem danos. Sob essa perspectiva, entre as funções da gelatinase, ao degradar o substrato e promover a adesão ao hospedeiro, também pode-se considerar o papel da enzima na sobrevivência destes micro-organismos.

A fim de esclarecer a presença de isolados contendo o gene *geE* porém sem atividade da enzima, poderia-se verificar também a presença dos genes do operon *fsr*, composto dos três genes (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*), uma vez que há relatos de que a ausência de algum dos genes do operon pode influenciar na expressão da gelatinase (Qin et al.; 2000; Lopes et al., 2006). Além disso, Poeta et al. (2005), ao encontrar baixa prevalência de *fsr* em *E. faecalis* de animais selvagens, associou este resultado a uma baixa virulência em isolados ambientais, indicando que a associação entre os resultados genotípicos e fenotípicos de *geE*, somados à investigação do operon *fsr*, sejam complementares.

A expressão da citolisina em lobos-marinhos foi avaliada somente para os isolados positivos para o gene *cyIA*. Nos quatro isolados positivos para o gene (B9, D7, D9 e D10) não foi possível detectar a expressão da enzima citolisina, uma vez que não foi verificada hemólise em meio ágar sangue. Eaton & Gasson (2001) também encontraram várias cepas com genes *cyI* silenciosos. Abriouel et al. (2008), em estudo comparativo entre os enterococos isolados de frutas e outros alimentos vegetais, água, solo e amostras clínicas, observaram que enterococos isolados a partir de alimentos e água apresentavam menor atividade hemolítica do que os isolados a partir de amostras clínicas, e que os isolados provenientes de vegetais e água não possuíam o gene *cyIA*.

Semedo et al. (2003) observaram uma significativa associação de beta-hemólise com o operon *cyI* completo. Não obstante, estes autores sugerem que os testes para avaliação da atividade hemolítica em meio contendo sangue de carneiro, como é o caso do presente trabalho, levariam a

resultados falso negativos quanto à presença do gene *cyIA*, pois as hemácias estariam menos suscetíveis à lise pela enzima citolítica.

Semedo et al. (2003) e Coburn & Gilmore (2003) explicam que a produção da citolisina é regulada por um conjunto de genes, e que a atividade citolítica está relacionada com uma sequência de fatores interligados, como a correta atuação de cada um dos genes do operon. Logo, tendo em vista que outros genes não foram avaliados e podem influenciar na expressão da citolisina, o fato de não ter sido detectado o *cyIA* nos demais isolados de lobos-marinhos também pode ser um indício de que estas linhagens teriam a atividade citolítica comprometida. Este resultado também pode ser explicado se outras cepas de enterococos apresentarem sequência gênica diferenciada, de maneira que ampliações negativas para os genes do operon sejam decorrentes da variabilidade destes isolados para impedir a detecção, ou que divergências evolutivas tenham levado as espécies de *Enterococcus* spp. a apresentarem atividade hemolítica mesmo sem o operon completo. Assim sendo, tanto quanto identificar o operon *cyl* completo, avaliar a atividade citolítica nos demais enterococos pode apontar diferentes mecanismos associados à expressão da citolisina em enterococos.

5.7 Relação entre perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência

A grande quantidade de enterococos que compõem resíduos contaminados e mesmo que são comensais no trato gastrointestinal de humanos e outros animais demonstra que, comparativamente, somente uma pequena fração destes micro-organismos desencadeia quadros infecciosos,

mesmo apresentando fatores e características consideradas de risco. Portanto, os traços associados a esses processos difundidos na espécie humana foram selecionados em virtude de seu papel em conferir aptidão para a ocorrência e sobrevivência em sistemas altamente competitivos. Os caracteres intrínsecos dos enterococos, sem dúvida, contribuem para a sua persistência nos locais de infecção. No entanto, como estes fatores parecem ter sido selecionados principalmente para aumentar a competitividade como bactéria comensal, ao comprometer essas características, a capacidade em causar doença, bem como a de sustentar o comensalismo, seriam influenciadas (Mundy et al., 2000).

Em nível molecular e celular, a doença enterocócica do trato gastrointestinal é predominantemente um processo de dois estágios, com uma colonização inicial, geralmente assintomática, por cepas com características distintas, tais como as resistências a antimicrobianos e genes de virulência, seguida pela invasão tecidual e aquisição de novos fatores exógenos que podem aumentar a virulência, tornando-a competente para suportar novas adversidades, colonizar outros nichos e competir com cepas nativas, aumentando a probabilidade de causar danos à saúde do hospedeiro. Contudo, as relações entre os enterococos, a virulência e o quadro infeccioso costumam ser confundidos porque, na maioria das vezes, ocorrem em pacientes em condições desfavoráveis, como nos imunocomprometidos, o que resulta em danos graves causados por isolados comensais que não necessariamente abriguem traços de virulência diferentes, mas que são promovidos por combinações sinérgicas (Mundy et al., 2000).

Como não ficou estabelecida a causa da morte dos lobos-marinhos, as associações entre a presença dos genes de virulência e os perfis de resistência antimicrobiana não permitiram uma avaliação direta entre causa e consequência destes aspectos na patogênese bacteriana em *Arctocephalus* spp., mas apenas diagnosticar a presença de traços comuns entre mamíferos marinhos e outros animais. Isto porque, de maneira geral, há relativamente poucos parâmetros para avaliação da contribuição dos fatores de virulência na patogênese da infecção, pois grande parte dos estudos concentra-se na aderência e atividade lítica de *E. faecalis*, mas que já permitem estabelecer conclusões sobre a contribuição destes fatores para o curso e a gravidade de doença enterocócicas. De qualquer maneira, é importante demonstrar o papel de cada elemento na virulência de enterococos (Mundy et al., 2000). Nos 93 isolados de lobos-marinhos sensíveis a todos os antimicrobianos testados, o gene *ace* foi detectado em 72%, seguido por *gelE* (62,4%), *asa* (8,6%) e *cylA* (4,3%).

Huycke et al. (1991) examinaram 190 isolados clínicos de *E. faecalis* quanto à produção de toxina citolítica e à resistência antimicrobiana, a fim de identificar características que melhorassem a capacidade do organismo em causar doenças. Os autores observaram que a resistência à gentamicina e o fenótipo conferido pela toxina citolítica podiam funcionar em sinergia, levando-os à conclusão de que os pacientes com bacteremia abrigavam cepas que expressam a citolisina hemolítica em um quadro de resistência à gentamicina, implicando no aumento de risco de mortalidade em infecções causadas por enterococos (Mundy et al., 2000). Esta associação não foi observada nos

enterococos de lobos-marinhos, que não apresentaram resistência à gentamicina e nem à ampicilina, ao cloranfenicol, à estreptomicina e à vancomicina, apesar de muitos deles possuírem o *ace* e o *geE*.

Linhagens de *E. faecalis* com resistência a aminoglicosídeos costumam expressar citolisina e substância de agregação, mostrando-se particularmente virulentas. Coque et al. (1995) analisaram as relações entre os traços e a doença desencadeada por enterococos, das quais, 25 e 33% das cepas derivadas de locais de infecção e do trato gastrointestinal de pacientes internados possuíam a característica de produção de toxina citolítica. Neste estudo, cerca de metade dos isolados possuíam genes para substância de agregação e gelatinase. Este percentual maior sugere que estes traços entraram na espécie avaliada anteriormente à toxina citolítica ou que estão associados a elementos mais móveis do que os que codificam a citolisina (Mundy et al., 2000). Apesar de determinantes de virulência que codificam substância de agregação e citolisina vinculados poderem ser cotransferidos e selecionados por resistência aos antimicrobianos, levando a um aumento da capacidade de colonização (Eaton & Gasson, 2001), nas linhagens de lobos-marinhos em que o *cyIA* foi detectado, apesar de o *asa* também estar presente, nenhuma resistência foi observada.

As substâncias de agregação, por comporem um sistema de troca de material genético codificado por plasmídeos responsivos a feromônios (Coburn et al., 1999), nas espécies que as apresentam, estariam melhor equipadas para participar de trocas genéticas e podem ser selecionadas pela presença de determinantes de resistência a antimicrobianos nesses

plasmídeos (Mundy et al., 2000). Além disso, a transferência de genes em *Enterococcus* spp. e os sistemas responsivos a feromônios são especialmente relevantes para os problemas associados com a resistência adquirida a glicopeptídeos como a vancomicina (Eaton & Gasson, 2001).

Entre os 67 isolados com alguma resistência à eritromicina, nitrofurantoína, tetraciclina, norfloxacina e/ou ciprofloxacina, 61,19% apresentaram o gene *ace*, seguido por *geE* (34,33%) e *asa* (16,42%). Destes 67, somente dois apresentaram resistência a mais de um dos antimicrobianos testados. O isolado *E. faecalis* (L7) apresentou resistência a ciprofloxacina e norfloxacina, e o *E. faecium* (F12) à ciprofloxacina, eritromicina e nitrofloxacina. Para estes isolados, no caso do *E. faecalis*, que apresentou resistência frente a dois antibióticos da mesma classe (quinolonas), o único gene relacionado a virulência detectado foi o *ace*. Já para o *E. faecium*, que apresentou resistência para ciprofloxacina, eritromicina e nitrofurantoína, sendo os três pertencentes a classes diferentes (quinolonas, macrolídeos e nitrofurantoínas, respectivamente), não foi detectado nenhum dos genes de virulência testados.

Em nosso estudo, nenhum resultado pareceu indicar relação direta entre algum dos fatores de virulência testados e o perfil de resistência observado, uma vez que os genes *ace* e *geE* mostraram-se amplamente distribuídos tanto em isolados que apresentaram características de resistência quanto nos que foram sensíveis aos antimicrobianos, e o principal gene associado a doenças (*cyIA*) não foi codificado por isolados que expressaram resistência. Assim sendo, o papel dos genes *ace* e *geE*, através da expressão

das enzimas por eles codificadas, parece ser a de facilitar a permanência destes micro-organismo no trato gastrointestinal dos lobos-marinhos.

5.8 Correlação filogenética das espécies de enterococos por RAPD-PCR

O sequenciamento do genoma de diversas cepas de enterococos e a utilização de diferentes técnicas para avaliação da diversidade têm sido aplicados tanto para identificar as linhagens envolvidas em epidemias e infecções quanto para medir as distâncias evolutivas entre grupos. Tal abordagem mostrou que cada bifurcação evolutiva está acompanhada da aquisição de novos traços metabólicos e de elementos móveis, e que a remodelação do genoma está associada com a inserção e movimentação de tais elementos. Como resultado, a diversidade de espécies de enterococos, em termos de divergência de sequência, assim como o conteúdo genético, pode abranger uma gama geralmente associada à especiação (Jiménez et al., 2013).

Técnicas como a amplificação aleatória de fragmentos de DNA (RAPD) demonstraram boa aplicabilidade em estudos epidemiológicos e de variabilidade genotípica (Nallapareddy et al., 2002). Embora não seja considerada a técnica ouro para genotipagem de *Enterococcus* spp., sua realização necessita de pouca quantidade de DNA e é considerada simples, rápida e reprodutível (Teixeira et al., 1995; Riboldi et al., 2008; Costa et al., 2009). Costa et al. (2009) avaliaram a variabilidade genética de linhagens de *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos, isolados de carne de frango e de infecção urinária, a fim de correlacionar os genótipos a partir do padrão gerado pela técnica de RAPD-PCR, e consideraram os resultados satisfatórios para o

estudo do perfil genético destes isolados visto que o padrão dos fragmentos de DNA foram constantes nas repetições realizadas. Já para os enterococos dos lobos-marinhos, alguns fragmentos não tiveram esta mesma repetibilidade.

Considerando cada amostra individualmente, a análise do perfil genotípico demonstrou que cinco amostras apresentaram somente um perfil cada uma. As outras três amostras apresentaram dois padrões de fragmentos cada. A maioria das amostras teve a presença de fragmentos considerados inespecíficos devido a pouca intensidade e não repetibilidade. Acredita-se que alguns deles poderiam ser indicativos da diversidade filogenética, como no caso da amostra **F**, em que os isolados identificados como *E. gallinarum* e *E. hirae* foram considerados com um mesmo padrão apesar da detecção de outros fragmentos fortes para alguns isolados. Entretanto, a fim de evitar considerações errôneas referentes à similaridade entre os isolados, foram adotados critérios comparativos para a obtenção do índice de similaridade a partir da visualização do gel de agarose e o padrão de bandas indicado pelo programa Gel-Pro Analyzer. Além deste caso, a amostra **G**, composta por *E. hirae*, também obteve similaridade total entre seus isolados apesar da ocorrência de fragmentos inespecíficos semelhantes aos da amostra **F**, e que, igualmente, poderiam ter relação com outros fatores discriminatórios.

A técnica de RAPD-PCR empregando o oligonucleotídeo M13 foi adotada por já ter sido utilizada em outros estudos que relacionavam perfis genotípicos de isolados de enterococos de amostras de diferentes fontes, visto que gera um padrão de fragmentos de DNA espécie-específico e possibilita detectar variabilidades interespecies (Riboldi et al., 2008; Costa et al., 2009).

Costa et al. (2009) consideraram a técnica adequada para a identificação de espécies de enterococos isoladas de amostras clínicas e alimentares. Na avaliação feita a partir dos resultados de lobos-marinhos, a presença de alguns fragmentos em comum nas oito amostras avaliadas permitiu correlacioná-las e estabelecer cinco grupos distintos considerando-se os 13 fragmentos gerados. Os Grupos I e III, ambos formados exclusivamente por um micro-organismo cada – *E. mundtii* e *E. faecium*, respectivamente – apresentaram perfis únicos, que poderiam ter seu perfil categorizado caso houvessem outros representantes da mesma espécie. No entanto, ao considerar, por exemplo, a amostra **J**, composta pelo *E. mundtii* e outros 19 *E. casseliflavus*, a técnica do RAPD-PCR permitiu distinguir dois perfis divergentes através de seu padrão de bandas, que poderia, mesmo sem a identificação das espécies, inferir sobre essa distinção. Assim, estes *E. casseliflavus* agrupados também apresentaram um perfil único, compondo o Grupo II.

O Grupo IV exibiu quatro ramificações distintas. Duas amostras (**D** e **E**) apresentaram o mesmo padrão de fragmentos, sugerindo que estes *E. faecalis* tenham uma mesma origem filogenética. O fato de estes isolados compartilharem fragmentos de mesmo tamanho com os *E. faecalis* da amostra **B** sugere maior proximidade filogenética do que com a outra ramificação formada pelos *E. faecalis* da amostra **L** e os dois isolados da amostra **C** (C2 e C18). Quanto aos dois isolados da amostra **C**, agrupados dentro do Grupo IV, o isolado C18, identificado por testes bioquímicos como sendo *E. hirae*, apresentou perfil idêntico ao isolado C2, *E. faecalis*, identificado por PCR

Multiplex. Nesse sentido, é provável que, apesar de não ter sido identificado pela técnica de PCR Multiplex e o perfil bioquímico apontar a espécie mais provável como sendo *E. hirae*, o isolado C18 seja um *E. faecalis* com atipia considerável. Para confirmação desta hipótese, poderia ser realizado o sequenciamento a fim de confirmar o resultado indicado pelo RAPD-PCR.

O Grupo V formado pelos isolados *E. hirae* e *E. gallinarum* das amostras **C**, **F** e **G**, tiveram sua similaridade baseada no único fragmento intenso e reprodutível o qual exibiram. Com isso, os resultados observados nos enterococos de lobos-marinhos atentam para o fato de que o primer M13 não foi suficiente para discriminar algumas das espécies ou detectar pequenas divergências em uma mesma espécie. Mesmo que estas linhagens tenham uma origem filogenética próxima, a geração de somente um fragmento reprodutível inviabiliza distinguir as espécies baseado nesta técnica e inferir sobre alguma diferenciação. Ainda assim, à exceção de *E. gallinarum*, cada espécie obteve um perfil distinto e, de maneira geral, ficou agrupada em um grupo, podendo ainda haver alguma variação, como observado entre os *E. faecalis*.

Não foi observada relação entre os perfis agrupados pelo RAPD-PCR e os perfis de resistência a antimicrobianos além daquelas já estabelecidas entre amostras e espécies. Costa et al. (2009) também não observaram correlação entre o perfil genotípico gerado pelo RAPD-PCR e a suscetibilidade antimicrobiana dos isolados analisados. Segundo estes autores, isso seria possível através da utilização de múltiplos oligonucleotídeos iniciadores, a fim de aumentar o número de fragmentos de DNA amplificados.

Sob essa perspectiva, Castillo-Rojas et al. (2013) observaram alta diversidade genética entre *E. faecalis* e *E. faecium* de amostras clínicas e diferentes amostras de água (subterrânea para consumo humano, de uma região úmida do México e residuais utilizadas na irrigação agrícola) através de análise pela técnica de Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE – *Pulsed-field Gel Electrophoresis*). Jiménez et al. (2013) também avaliaram os perfis dos enterococos obtidos das amostras de leite materno através da técnica de PFGE. Contudo, anteriormente, as cepas foram submetidas à técnica de RAPD a fim de identificar linhagens de um mesmo hospedeiro. Assim, cada perfil observado no RAPD foi submetido à análise de PFGE. Esta pode ser uma opção a fim de estreitar a avaliação da diversidade entre os isolados de lobos-marinhos obtidos no presente trabalho uma vez que, no estudo de Jiménez et al. (2013), apesar da maioria das amostras ter apresentado uma única espécie, a combinação destas técnicas permitiu revelar que não houve uma única estirpe por amostra, somente em raras exceções. Esta análise também identificou a existência de uma cepa de *E. faecalis* que percorreu três amostras distintas (de suínos). Não obstante, os perfis obtidos após o PFGE foram ainda caracterizados pela técnica de Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST) baseada em determinantes de virulência e atividades hemolítica e citolítica dos *E. faecalis*, resultando em 8 tipos específicos de sequências diferentes (STs) e ainda quatro complexos clonais de maior ocorrência entre as amostras. Alguns dos STs detectados entre as cepas de *E. faecalis* das amostras de suínos ou felinos pertenciam a complexos clonais que já haviam sido isolados e associados a infecções

hospitalares na Europa. Estes resultados sugerem que o leite de diferentes espécies de mamíferos pode constituir uma fonte natural de disseminação de tais micro-organismos para a prole (Jiménez et al., 2013).

Lebreton et al. (2014) relatam uma série de estudos que compararam os perfis genéticos de enterococos (*E. faecalis* e *E. faecium*) com perfis de resistência a antimicrobianos isolados a partir de seres humanos e outros animais, principalmente, através de técnicas como PFGE, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) e MLST. Desta maneira, é possível identificar linhagens de clones distribuídos em diferentes fontes, indicando que a partilha de um habitat é um importante fator de risco para a propagação de enterococos. Por fim, é importante ressaltar que a ocorrência de clones em uma população bacteriana ambiental não inviabiliza a atuação nas comunidades microbianas, visto que, em casos de quadros infecciosos, ou mesmo de contribuição para o equilíbrio microbiano ao hospedeiro, as consequências geradas são predominantemente desencadeadas por populações microbianas, sejam elas compostas de maior ou menor variabilidade genética.

6. CONCLUSÃO

Isolamento, identificação e prevalência de *Enterococcus* spp.

Foi possível isolar *Enterococcus* spp. de amostras de fezes de lobos-marinhos, aplicando metodologia seletiva convencional para este grupo, e sendo confirmado por PCR gênero-específico. A associação de técnicas de PCR Multiplex empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, testes bioquímicos convencionais e sequenciamento do 16S rRNA permitiu a identificação de todas as espécies de enterococos isoladas, evidenciando a complementariedade entre os métodos.

A identificação dos enterococos, estabelecida sobre as oito amostras de *Arctocephalus* spp., apontou a espécie *E. faecalis* como a mais prevalente, seguida por *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii* e *E. faecium*. A baixa diversidade de espécies por amostras (1-3) demonstra que algum determinante do comportamento dos lobos-marinhos pode influenciar nesta prevalência.

Suscetibilidade Antimicrobiana

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana apontaram que mais da metade dos isolados foi sensível a todos os antimicrobianos testados,

e que as propriedades de resistência foram encontradas para eritromicina, nitrofurantoína, tetraciclina, norfloxacina e ciprofloxacina. O grande número de estirpes sensíveis corrobora com a hipótese de que a ausência de contato direto com antibióticos mantém os níveis de resistência baixos. Porém, a presença de fenótipo resistente nestes animais sugere que possa estar ocorrendo este contato, mesmo que em dosagens mínimas, via cadeia alimentar ou poluentes aquáticos; ou ainda, que a resistência intrínseca deste gênero para alguns dos antimicrobianos testados poderia ter sido estimulado por outros fatores não identificados no presente estudo, de maneira a expressar resistência.

Dentre os enterococos resistentes à tetraciclina e à eritromicina, não foi observada a presença do gene *tet(L)*, e uma baixa frequência dos genes *tet(M)* e *erm(B)*. A baixa detecção destes genes, frequentemente indicados como principais mecanismos de resistência em enterococos de humanos e outras fontes, sugere que os enterococos de lobos-marinhos tenham sua resistência determinada por outro mecanismo.

Fatores de virulência

Quanto à presença dos genes de virulência, maior incidência foi observada para *ace* e *gelE*, e menor incidência para *asa* e *cyfA*. A presença destes genes sugere que cepas de enterococos do trato gastrointestinal de lobos-marinhos podem abrigar genes comumente relacionados a danos à saúde humana, embora não tenha sido comprovada esta associação.

A atividade das enzimas gelatinase e citolisina não foram determinadas diretamente pela presença dos genes *gelE* e *cyIA*, respectivamente. Como conclusão, a presença de genes silenciosos foi observada.

Perfil genotípico por RAPD-PCR

A análise do RAPD-PCR gerou fragmentos de DNA distintos que permitiram reunir os isolados em cinco grupos, separados principalmente de acordo com a espécie bacteriana. A técnica mostrou-se eficiente na caracterização da origem filogenética da maioria das espécies avaliadas. Entretanto, a revelação de um baixo número de fragmentos e a não diferenciação entre os isolados *E. gallinarum* de outras cepas por este método, incita o acoplamento de mais técnicas moleculares a fim de concluir sobre outros aspectos fundamentais a respeito da natureza destes micro-organismos.

Considerações finais

Não foi possível estabelecer relação entre o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e os fatores de virulência. Da mesma forma, os perfis observados pelo RAPD-PCR não demonstraram alguma tendência quanto ao comportamento frente aos antimicrobianos ou mesmo quanto à presença dos genes de virulência.

A presença destes fatores pode ter origem no resistoma ambiental e ser independente do contato com vias de proliferação. Ao considerar que algumas características dos enterococos são inerentes e anteriores à pressão antrópica, os dados obtidos podem evidenciar a importância destas

características para a colonização de diferentes habitats. No entanto, sendo o ambiente marinho um meio de disseminação, é importante considerar o potencial deste gênero em ocasionar doenças nestes animais.

O baixo número de exemplares da espécie *A. tropicalis* não permitiu associar as características detectadas entre os enterococos obtidos com a distribuição geográfica particular das espécies de lobos-marinhos avaliadas. Entretanto, ficou evidente que diferentes espécies do gênero *Enterococcus* spp. compõem o trato gastrointestinal deste grupo de mamíferos marinhos, podendo influenciar sobre o equilíbrio da microbiota e as condições saudáveis dos lobos-marinhos.

Por fim, o estudo de enterococos no ambiente marinho tem sido apontado como um indicador da saúde de muitos componentes deste ecossistema. Estudá-los contribui tanto para a compreensão da ecologia dos lobos-marinhos quanto para a elucidação da trajetória de propagação de linhagens bacterianas. Nesse sentido, é fundamental elevar o número amostral de animais marinhos a fim de ampliar as relações entre os aspectos destacados no presente trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, FM; AGERSO, Y; GERNER-SMIDT, P; MADSEN, M; JENSEN, LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.37, p.127-137, 2000.

ABRIOUEL, H; OMAR, NB; MOLINOS, AC; LÓPEZ, RL; GRANDE, MJ; VIEDMA, PM; ORTEGA, E; CAÑAMERO, MM; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology.** v. 123, p. 38-49, 2008.

ALFONSINI, E; MÉHEUST, E; FUCHS, S; CARPENTIER, FG; QUILLIVIC, Y; VIRICEL, A; HASSANI, S; JUNG, JL. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. **ZooKeys**, v.365, p.5-24, 2013.

ANDERSON, KL; WHITLOCK, JE; HARWOOD, VJ. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. **Appl Environ Microbiol**, v.71, n.6, p.3041-3048, 2005.

ARVANITIDOU, M; KATSOUYANNOPOULOS, V; TSAKRIS, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing Waters. **J. Med. Microbiol.**, v.50, p.1001-1005, 2001.

BARRETO, A. Apostila de Nectologia – Mamíferos Marinhos. CTTMar/UNIVALI, 2001. Disponível em <http://www.zoo.ba.gov.br/wp-content/files/apostila_mamiferos_marinhos.pdf>. Acesso em 19 junho 2014.

BASTIDA, R; RODRIGUEZ, D; SECCHI, ER; DA SILVA, VMF. Mamíferos Acuáticos de Sudamérica y Antártida. Buenos Aires. Vazquez Mazzini Editores, v.1, 360 p., 2007.

BENNANI, M; AMAROUCH, H; OUBRIM, N; COHEN, N. Identification and Antimicrobial Resistance of Fecal Enterococci Isolated In Coastal Mediterranean Environments of Morocco. **European Journal of Scientific Research**, v.70, n.2, p.266-275, 2012.

BENTORCHA, F; DE CESPÉDÈS, G; HORAUD, T. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.35, n.5, p.808-812, 1991.

BESTER, MN. Subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*, at Gough Island (Tristan da Cunha Group). *In* Status, biology and ecology of fur seals. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Technical Report. National Marine Fisheries Service (NMFS), CROXALL, JP & GENTRY, RL (editors), v.51, p. 57-60, Montevideo, Uruguay, 1987.

BOGOMOLNI, AL; GAST, RJ; ELLIS, JC; DENNETT, M; PUGLIARES, KR; LENTELL, BJ; MOORE, MJ. Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. **Dis Aquat Org.**, v.81, p.13-38, 2008.

BRAGA, ACPV; BRANDÃO, AP; CARVALHAES, CHVFG; SIQUEIRA, I; DEL'ALAMO, L; BRANDILEONE, MCC; MARTINO, MDV. Módulo 4 – Gram positivos, 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm>. Acesso em 11 de janeiro de 2014.

BYAPPANAHALLI, MN; NEVERS, MB; KORAJKIC, A; STALEY, ZR; HARWOODC, VJ. Enterococci in the Environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.76, n.4, p.685-706, 2012.

CAMARGO, ILBC; ZANELLA, RC; GILMORE, MS; DARINI, ALC. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.273-278, 2008.

CASSENEGO, APV; D'AZEVEDO, PA; RIBEIRO, AML; FRAZZON, J; VAN DER SAND, ST; FRAZZON, APG. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.480-488, 2011.

CASTILLO-ROJAS, G; MAZARI-HIRÍART, M; PONCE DE LEÓN, S; AMIEVA-FERNÁNDEZ, RI; AGIS-JUÁREZ, RA; HUEBNER, J; LÓPEZ-VIDAL, Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p.1-10, 2013.

CAUMO, K; DUARTE, M; CARGNIN, ST; RIBEIRO, VB; TASCA, T; MACEDO, AJ. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.11, n.16, p.89-118, 2010.

CECLIMAR – Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos. Instituto de Biociências, UFRGS. Imbé, Rio Grande do Sul. Disponível em

<<http://www.ufrgs.br/ceclimar/mortalidade-de-pinguins-no-litoral-do-rs>>. Acesso em 12 maio 2014.

CHENG, S; MCCLESKEY, FK; GRESS, MJ; PETROZIELLO, JM; LIU, R; NAMDARI, H; BENINGA, K; SALMEN, A; DEL VECCHIO, VG. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.5, p.1248-1250, 1997.

CHUARD, C; RELLER, LB. Bile-Esculin Test for Presumptive Identification of Enterococci and Streptococci: Effects of Bile Concentration, Inoculation Technique, and Incubation Time. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1135-1136, 1998.

CLEWELL, DB. Bacterial Sex Pheromone-Induced Plasmid Transfer. **Cell**, v.73, p.9-12, 1993.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, Wayne, PA, USA, 2013.

COBURN, PS; GILMORE, MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**. v.5, n.10, p.661-669, 2003.

COBURN, PS; HANCOCK, LE; BOOTH, MC; GILMORE, MS. A Novel Means of Self-Protection, Unrelated to Toxin Activation, Confers Immunity to the Bactericidal Effects of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. **Infection and Immunity**, v.67, n.7, p.3339-3347, 1999.

COQUE, TM; PATTERSON, JE; STECKELBERG, JM; MURRAY, BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. **J. Infect. Dis.** v.171, p.223-229, 1995.

COSTA, AG; FRAZZON, APG; D'AZEVEDO, PA; FRAZZON, J; VAN DER SAND, ST. Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR. **Biociências**, Porto Alegre, v.17, n.1, p.74-81, 2009.

DEPARDIEU, F; PERICHON, B; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.5857-5860, 2004.

DEVRIESE, LA; VAN DE KERCKHOVE, A; KILPPER-BALZ, R; SCHLEIFER, KH. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.3, p.257-259, 1987.

DIARRA, MS; REMPEL, H; CHAMPAGNE, J; MASSON, L; PRITCHARD, J; TOPP, E. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.24, p. 8033–8043, 2010.

DEIBEL, RH. The Group D Streptococci. **Bacteriological Reviews**, v.28, n.3, p.330-366, 1964.

DONATO, ST; SIDRIM, JJC (orient). Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente a Biologia Molecular em identificações discrepantes. 86 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, Brasil. 2007.

DREHMER, CJ; FABIÁN, ME (orient.). Variação geográfica em *Otaria byronia* (de Blainville, 1820) (Pinnipedia, Otariidae) com base na morfometria sincraniana. 202 f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. Janeiro, 2005.

EATON, TJ; GASSON, MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.

ECOMAMA - Instituto de Estudos da Ecologia de Mamíferos Marinhos. Pela vida dos oceanos. Disponível em <<http://www.ecoterrabrasil.com.br/home/index.php?pg=destaques&cd=1246>>. Acesso em 10 junho 2014.

EDLUND, C; LINDQVIST, L; NORD, CE. Norfloxacin binds to human fecal material. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.32, n.12, p.1869-1874, 1988.

EUZÉBY, JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Genus *Enterococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** Disponível em <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em 27 maio 2014.

FACKLAM, RR; CARVALHO, MGS; TEIXEIRA, LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. *In* The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Eds, Washington: **ASM Press**, p.1-54, 2002.

FACKLAM, RR. Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. **Appl. Microbiol**, v.23, n.6, p.1131-1139, 1972.

FDA - Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 1998. Disponível em <[http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/Laboratory Methods/ucm2006949.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm)>. Acesso em 27 maio 2014.

FERGUSON, DM; MOORE, DF; GETRICH, MA; ZHOWANDAI, MH. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.598-608, 2005.

FISHER, K; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FRACALANZZA, SAP; SCHEIDEGGER, EMD; SANTOS, PF; LEITE, PC; TEIXEIRA, LM. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

FRAZZON, APG; GAMA, BA; HERMES, V; BIERHALS, CG; PEREIRA, RI; GUEDES, AG; D'AZEVEDO, PA ; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**, v.26, p.365-370, 2010.

Fundación Mundo Marino. Lobos Marinos – Pinnípedos. Material de divulgação impresso. Disponível em <<http://www.fundmundomarino.com.ar/index.php>>. Acesso em 02 junho 2014.

GAMA, BA; FRAZZON, J (orient.). Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. 73 f. Dissertação (Mestrado). Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Janeiro, 2008.

GERACI, JR; LOUNSBURY, VJ. Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings. National Aquarium in Baltimore, Baltimore. 2ª Ed. p.177-188, 2005.

GILMORE, MS. Preface. In GILMORE MS; CLEWELL DB; IKE Y; et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Int J Food Microbiol.**, v.88, p.215–222, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci in foods. **FEMS Microbiology**. v.26, p.163-171, 2002.

GOLIŃSKA, E; TOMUSIAK, A; GOSIEWSKI, T; WIĘCEK, G; MACHUL, A; MIKOŁAJCZYK, D; BULANDA, M; HECZKO, PB; STRUS, M. Virulence factors

of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v.19, n.23, p.3562-3572, 2013.

GONTANG, EA; FENICAL, W; JENSEN, PR. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.73, p. 3272-3282, 2007.

HEANEY, CD; SAMS, E; DUFOUR, AP; BRENNER, KP; HAUGLAND, RA; CHERN, E; WING, S; MARSHALL, S; LOVE, DC; SERRE, M; NOBLE, R; WADE, TJ. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. **Epidemiology**, v.23, n.1, p.95-106, 2012.

HEINZELMANN, LS; HAAG, KL (orient.). Variabilidade genética no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de três espécies de mamíferos marinhos da costa do Rio Grande do Sul. 66 f. Dissertação (Mestrado). Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil., 2002.

HIGDON, JW; BININDA-EMONDS, ORP; BECK, RMD; FERGUSON, SH. Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.216-235, 2007.

HILL, SL; PHILLIPS, T; ATKINSON, A. Potential Climate Change Effects on the Habitat of Antarctic Krill in the Weddell Quadrant of the Southern Ocean. **PLoS ONE**, v.8, n.8, p.e72246, 2013.

HUEY, B; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli* minisatellite probe from bacteriophage M13. **Journal of Bacteriology**, Berkeley, v.171, n.5, p.2528-2532, 1989.

HUYCKE, MM; SPIEGEL, CA, GILMORE, MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.35, p.1626-1634, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default.shtm>>. Acesso em 11 junho 2014.

IUCN. Internacional Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species 2013. Version 2013.2. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em 10 junho 2014.

JACKSON, CR; FEDORKA-CRAY, PJ; BARRETT, JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3558-3565, 2004.

JACKSON, LC; REYES, LAM; CORDIÉS, MLH. Quinolonas y terapia antimicrobiana. **Acta Medica**, v.8, n.1, p.58-65, 1998.

JETT, BD; HUYPKE, MM; GILMORE, MS. Virulence of Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.4, p. 462-478, 1994.

JIMÉNEZ, E; LADERO, V; CHICO, I; MALDONADO-BARRAGÁN, A; LÓPEZ, M; MARTÍN, V; FERNÁNDEZ, L; FERNÁNDEZ, M; ÁLVAREZ, MA; TORRES, C; RODRÍGUEZ, JM. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human Milk. **BioMedCentral Microbiology**, v.13, n.288, 2013.

JOHNSTON, LM; JAYKUS, LA. Antimicrobial Resistance of **Enterococcus** Species Isolated from Produce. **Appl Environ Microbiol.**, v.70, n.5, p.3133-3137, 2004.

JOHNSON, SP; NOLAN, S; GULLAND, FM. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central and northern California. **J Zoo Wildl Med.**, v.29, p.288-294, 1998.

KATZ, H; MORGADES, D; CASTRO-RAMOS, M. Pathological and Parasitological Findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. **ISRN Zoology**, v.2012, p.1-7, 2012.

KE, D; PICARD, FJ; MARTINEAU, F; MENARD, C; ROY, PH; OUELLETTE, M; BERGERON, MG. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. **J. Clin. Microbiol**, v.37, p.3497-3503, 1999.

KOCH, S; HUFNAGEL, M; THEILACKER, C; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine** v.22, p.822-830, 2004.

KRISTICH, CJ; RICE, LB; ARIAS, CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. *In* GILMORE MS; CLEWELL DB; IKE Y; SHANKAR, N [editors]. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LAYTON, BA; WALTERS, SP; LAM, LH; BOEHM, AB. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.539-547, 2010.

LEBRETON, F; WILLEMS, RJL; GILMORE, MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. *In* GILMORE MS; CLEWELL DB; IKE Y; SHANKAR, N [editors]. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LEI N° 5.197, DE 3 DE JANEIRO DE 1967. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l5197.htm>. Acesso em 5 junho 2014.

LEI Nº 7.643, DE 18 DE DEZEMBRO DE 1987. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7643.htm>. Acesso em 5 junho 2014.

LOPES, MFS; SIMÕES, AP; TENREIRO, R; MARQUES, JJF; CRESPO, MTB. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**. v.112, p.208-214, 2006.

LU, J; DOMINGO, JWS; LAMENDELLA, R; EDGE, T; HILL, S. Detection of Bacteria in Gull Feces Phylogenetic Diversity and Molecular. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.74, n.13, p.3969-3976, 2008.

LUDWIG, W; SCHLEIFER, K; WHITMAN, WB. Family IV. Enterococcaceae fam. nov. In VOS, P; GARRITY, G; JONES, D; KRIEG, NR; LUDWIG, W; RAINEY, FA; et al., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**., 2nd ed., v.3 (The Firmicutes) (p. 594). New York: Springer., 2009.

MACHADO, ASD; PAPA, PC (orient.). Estudo do sistema reprodutor masculino do Lobo-Marinho-do-Sul (*Arctocephalus australis*). 135 f. Dissertação (Mestrado). Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2006.

MANERO, A; BLANCH, AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.10, p.4425-4430, 1999.

MANNU, L; PABA, A; DAGA, E; COMUNIAN, R; ZANETTI, S; DUPRÈ, I; SECHI, LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**., v.88, p.291-304, 2003.

MARRA, A; DIB-HAJJ, F; LAMB, L; KACZMAREK, F; SHANG, W; BECKIUS, G; MILICI, AJ; MEDINA, I; GOOTZ, TD. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**. v.58, p.59-65, 2007.

MARACCINI, PA; FERGUSON, DM; BOEHM, AB. Diurnal Variation in Enterococcus Species Composition in Polluted Ocean Water and a Potential Role for the Enterococcal Carotenoid in Protection against Photoinactivation. **Appl Environ Microbiol.**, v.78, n.2, p.305-310, 2012.

MASUNARI, A; TAVARES, LC. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, 2006.

MEDEIROS, AW; FRAZZON, APG (orient.). Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e

clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. 113 f. Dissertação (Mestrado). Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Janeiro, 2011.

MOORE, DF; GUZMAN, JA; MCGEE, C. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1017-1025, 2008.

MOORE, DF; ZHOWANDAI, MH; FERGUSON, DM; MCGEE, C; MOTT, JB; STEWART, JC. Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic techniques for identification of enterococci from the marine environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1272-1281, 2006.

MOTA, RA; SILVA, KPC; FREITAS, MFL; PORTO, WJN; SILVA, LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

MOTE, BL; TURNER, JW; LIPP, EK. Persistence and Growth of the Fecal Indicator Bacteria Enterococci in Detritus and Natural Estuarine Plankton Communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, n.8, p.2569-2577, 2012.

MOURA, TM; FRAZZON, APG. Análise fenotípica e genotípica de estafilococos manitol positivos isolados de morcilhas de fabricação artesanal comercializadas na cidade de Pelotas. 96 f. Dissertação (Mestrado). Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Fevereiro, 2011.

MUNDT, JO. Occurrence of Enterococci: Bud, Blossom, and Soil Studies. **J Appl Microbiol.** v.9, n.6, p.541-544, 1961.

MUNDT, JO. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. **J Appl Microbiol.**, v.11, n.2, p.136-140, 1963.

MUNDY, LM; SAHM, DF; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v.13, n.4, p.513-522, 2000.

MURRAY, BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n.1, p.37-47, 1998.

MURRAY, BE. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, n.1, p.46-65, 1990.

NACHTIGALL, G; JESUS, AG; ZVOBODA, DA; SANTESTEVAN, NA; MINOTTO, E; MOURA, TM; D'AZEVEDO, P; FRAZZON, J; VAN DER SAND, S; FRAZZON, APG. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 235-241, 2013.

NALLAPAREDDY, SR; QIN, X; WEINSTOCK, GM; HÖÖK, M; MURRAY, BE. *Enterococcus faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well as Collagen Type I. **Infection and Immunity**, v.68, n.9, p.5218–5224, 2000.

NORDMANN, P; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.463-469, 2005.

OLIVEIRA, LR. Carnívoros Marinhos. In WEBER, MM; ROMAN, C; CÁCERES, NC (orgs.). Mamíferos do Rio Grande do Sul. Ed. UFSM, p.405-429, 2013.

PEREIRA, CS; AMORIM, SD; SANTOS, AFM; SICILIANO, S; MORENO, IB; OTT, PH; RODRIGUES, DP. *Plesiomonas shigelloides* and Aeromonadaceae family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.749-755, 2008.

PHILLIPS, MC; SOLO-GABRIELE, HM; PIGGOT, AM; KLAUS, JS; ZHANG, Y. Relationships Between Sand and Water Quality at Recreational Beaches. **Water Res.**, v.45, n.20, p.6763-6769, 2011.

POETA, P; COSTA, D; SÁENZ, Y; KLIBI, N; RUIZ-LARREA, F; RODRIGUES, J; TORRES, C. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. **J. Vet. Med. B.**, v.52, p.396-402, 2005.

PRICHULA, J; ZVOBODA, DA; PEREIRA, RI; SANTESTEVAN, NA; MEDEIROS, AW; MOTTA, AS; D'AZEVEDO, PA; GIORDANI, AR; FRAZZON, APG. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil. **R. bras. Ci. Vet.**, v.20, n.2, p.104-109, 2013.

QIN, X; SINGH, KV; WEINSTOCK, GM; MURRAY, BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. **Infection and Immunity**, v.68, n.5, p.2579-2586, 2000.

RIBOLDI, GP; MATTOS, EP; FRAZZON, APG; D'AZEVEDO, PA; FRAZZON, J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, Porto Alegre, v.48, n.1, p.31-37, 2008.

ROCHA-CAMPOS, CC; CÂMARA, IG (org.). Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes: versão III / ROCHA-CAMPOS, CC; MORENO, IB; ROCHA, JM; JUNIOR, JTP; GROCH, KR; et al. Brasília : Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011. 156 p.

ROSE, JM; GAST, RJ; BOGOMOLNI, A; ELLIS, JC; LENTELL, BJ; TOUHEY, K; MOORE, M. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. **FEMS Microbiol Ecol**, v.67, p.421-431, 2009.

RYU, H; HENSON, M; ELK, M; TOLEDO-HERNANDEZ, C; GRIFFITH, J; BLACKWOOD, D; NOBLE, R; GOURMELON, M; GLASSMEYER, S; SANTO DOMINGO, JW. Development of Quantitative PCR Assays Targeting the 16S rRNA Genes of Enterococcus spp. and Their Application to the Identification of Enterococcus Species in Environmental Samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.79, n.1, p.196-204, 2013.

SEMEDO, T; SANTOS, MA; MARTINS, P; LOPES, MFS; MARQUES, JJJ; TENREIRO, R; CRESPO, MTB. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.41, n.6, p.2569-2576, 2003.

ŠEVEC, P; FRANZ, CMAP. The genus Enterococcus. In HOLZAPFEL, WH; WOOD, BJB (editors). Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. **John Wiley & Sons Ltda**, 1ª Ed., p.175-211, 2014.

SHEPARD, BD; GILMORE, MS. Differential Expression of Virulence-Related Genes in Enterococcus faecalis in Response to Biological Cues in Serum and Urine. **Infection and Immunity**, v.70, n.8, p.4344-4352, 2002.

STEWART, JR; TOWNSEND, FI; LANE, SM; DYAR, E; HOHN, AA; ROWLES, TK; STAGGS, LA; WELLS, RS; BALMER, BC; SCHWACKE, LH. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. **Diseases of Aquatic Organisms.**, v.108, p.91-102, 2014.

SUTCLIFFE, J; GREBE, T; TAIT-KAMRADT, A; WONDRACK, L. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.11, p.2562-2566, 1996.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v.33, p.281-301, 2000.

TEIXEIRA, LM; FACKLAM, RR; STEIGERWALT, AG; PIGOTT, NE; MERQUIOR, VL; BRENNER, DJ. Correlation between phenotypic

characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Atlanta, v.33, n.6, p.1520-1523, 1995.

TEIXEIRA LM; CARVALHO, MG; SHEWMAKER, PL; FACKLAM, RR. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W. **Manual of Clinical Microbiology** 10th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p.350-364, 2011.

THAL, LA; CHOW, JW; MAHAYNI, R; BONILLA, H; PERRI, MB; DONABEDIAN, SA; JSILVERMAN, J; TABER, S; ZERVOS, MJ. Characterization of Antimicrobial Resistance in Enterococci of Animal Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.9, p. 2112-2115, 1995.

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals: prejudices, perceptions and realities. **J Antimicrob Chemother**, v.53, n.1, p.26-27, 2004.

VAN DEN BOGAARD, AE; STOBBERINGH, EE. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.327-335, 2000.

VAZ-FERREIRA, R; LEON, AP. South American fur seal, *Arctocephalus australis*, in Uruguay. In Status, biology and ecology of fur seals. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Technical Report. National Marine Fisheries Service (NMFS), CROXALL, JP & GENTRY, RL (editors), v.51, p. 29-32, Montevideo, Uruguay, 1987.

WILLEMS, RJL; HOMAN, W; TOP, J; SANTEN-VERHEUVEL, MV; TRIBE, D; MANZIOROS, X; GALLIARD, C; VANDENBROUCKE-GRAULS, CMJE; MASCINI, EM; KREGTEN, EV; EMBDEN, JDAV; BONTEN, MJM. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**. v.357, p.853-855, 2001.

WRIGHT, GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews | Microbiology**, v.5, p.175-186, 2007.

ZERBINI, A; SICILIANO, S; PIZZORNO, JLA. Programa de avaliação e ações prioritárias para as zonas costeira e marinha: diagnóstico para os mamíferos marinhos. ANP, 1999, 56 p.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Manual de coleta e remessa de amostras

As amostras biológicas dos animais deverão ser coletadas para a realização de pesquisa na área de bacteriologia. A coleta deverá ser feita, sempre que possível, dentro de técnicas asséptica e todas as amostras deverão ser mantidas sob refrigeração em temperatura mais baixa possível - se forem coletadas a campo, em isopor com gelo e, assim que chegarem nas instalações apropriadas, em freezer ou congelador (-20°C), sendo encaminhadas ao laboratório o mais rápido possível.

Devem ser coletadas amostras de fezes de animais vivos ou recém-mortos que tenham sido encaminhados para o centro de reabilitação ou encontrados na praia. A coleta pode ser feita por *swab* retal de animais vivos ou de conteúdo intestinal de animais mortos (preferencialmente até *Code 2*).

Técnica do *swab* retal: (1) Inserir o *swab* no esfíncter anal, fazendo movimentos rotatórios; (2) Ao retirar, verificar se existe coloração fecal no algodão; (3) Armazenar o *swab* no invólucro especial contendo meio de transporte; (4) Identificar o animal de origem e encaminhar ao laboratório.

Técnica de coleta de conteúdo intestinal de animais mortos: (1) Com bisturi ou tesoura estéril, realizar a abertura da porção final do intestino grosso; (2) Com uma espátula estéril, coletar cerca de 40 mL de conteúdo intestinal; (3) Armazenar em frasco estéril; (4) Identificar o animal de origem e encaminhar ao laboratório.