

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus*  
spp. ISOLADOS DE AMOSTRAS FECAIS DE TARTARUGAS MARINHAS  
RECUPERADAS NO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

REBECA INHOQUE PEREIRA

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Porto Alegre

Março/2016



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus*  
spp. ISOLADOS DE AMOSTRAS FECAIS DE TARTARUGAS MARINHAS  
RECUPERADAS NO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

REBECA INHOQUE PEREIRA

Farmacêutica - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Rebeca Inhoque

Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. / Rebeca Inhoque Pereira.

-- 2016.  
154 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Coorientador: Pedro Alves d'Azevedo.

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, 2016.

1. *Enterococcus* spp.. 2. Tartarugas marinhas. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. d'Azevedo, Pedro Alves, coorient. III. Título.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original”

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon, por me apresentar a microbiologia lá em 2007, por ensinar com tanta paixão e entusiasmo a ponto de eu não querer desapegar nem dela, nem da microbiologia.

Ao Prof. Pedro d'Azevedo, pela oportunidade de fazer parte de um grupo tão rico em recursos intelectuais e afetivos como o grupo do LCGP da UFCSPA. Em especial aos alunos Adriana, Gabriela, Renata, Mariana e Thiago por estarem sempre dispostos a me ajudar.

À toda equipe do CECLIMAR, da UFRGS, por todo aprendizado sobre os animais marinhos e pela concessão das amostras.

À melhor equipe de estagiários que eu poderia ter, Guilherme, Leonardo e Neidimar obrigada pela competência e pela responsabilidade. Esse trabalho é todo nosso. Não sei como me aguentam?!

Às minhas colegas de trabalho da UFCSPA, Andréia, Janira e Vanessa, pelo apoio nos momentos de ausência no trabalho. Em especial a Janira, há tanto tempo em minha vida, por todo incentivo e aprendizado, por ser meu fôlego em vários momentos.

Às minhas queridas amigas Alessandra, Bianca, Gabriela, Marília e Naiara pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e pelas risadas sem fim.

Ao meu namorado Filipe pelo seu companheirismo, respeito, e paciência infinita; e a todos os Ferraresi e Hecktheuer pela acolhida e carinho.

À minha família (não sei se agradeço ou se peço desculpas), por respeitarem meus momentos de ausência e de estresse, mas principalmente por me incentivarem sempre na busca pelo conhecimento. Aos meus pais Ana e Rogério toda a minha gratidão.

Aos meus avós Gema e Lorival, estarão sempre em meu coração e na minhas melhores lembranças.

# DIVERSIDADE GENÉTICA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* spp. ISOLADOS DE AMOSTRAS FECAIS DE TARTARUGAS MARINHAS RECUPERADAS NO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.<sup>1</sup>

Autor: Rebeca Inhoque Pereira

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

## RESUMO

Os *Enterococcus* spp. apresentam natureza ubiqüitária e são encontrados no trato gastrointestinal de diversos animais. Entretanto, estudos desses microorganismos associados a tartarugas marinhas são escassos. Os objetivos deste estudo foram: isolar enterococos a partir de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul; determinar a prevalência das espécies; avaliar seu perfil de suscetibilidade antimicrobiana; verificar a presença de genes relacionados à resistência e à virulência e; analisar sua diversidade genética. Um total de 158 enterococos foram identificados como *E. faecalis* (55,7%), *E. faecium* (23,4%), *E. hirae* (15,2%) e *E. casseliflavus* (5,7%). A maioria dos isolados foi suscetível aos antimicrobianos testados, no entanto, fenótipos de resistência foram encontrados para eritromicina (34,2%), rifampicina (32,9%) e tetraciclina (0,63%). O gene de resistência à eritromicina *msrC* foi encontrado em todos os *E. faecium* resistentes, já o gene *erm(B)*, não foi detectado. Somente um isolado foi resistente à tetraciclina, e este não apresentou nenhum dos genes testados. Os genes de virulência, *gelE* e *ace* (98,86%), *asa* (68,18%) e *cylA* (40,90%) foram detectados somente em *E. faecalis*. A atividade de gelatinase e citolisina foi verificada em 87 e 19 isolados, respectivamente. A maioria dos enterococos não foi capaz de formar biofilme. A análise dos perfis gerados por PFGE revelou um grande número de clones. Em conclusão, diferentes espécies de enterococos compõem a microbiota do trato gastrointestinal das tartarugas marinhas e a presença de determinantes de resistência e virulência nestes animais pode estar relacionada a fatores antropogênicos ou, ainda, ter origem no resistoma ambiental.

<sup>1</sup>Dissertação 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. (154p.) março, 2016.

**GENETIC DIVERSITY AND VIRULENCE FACTORS OF *Enterococcus* spp.  
FROM FECAL SAMPLES OF SEA TURTLES RECOVERED ON THE NORTH  
COAST OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.<sup>1</sup>**

Author: Rebeca Inhoque Pereira

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Advisor: Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

**ABSTRACT**

*Enterococcus* spp. shows an ubiquitous nature and are found in the gastrointestinal tract of several animals. However, studies of enterococcus in sea turtles are scarce. The aims of this study were: to isolate *Enterococcus* spp. from fecal samples of sea turtle found on the North coast of Rio Grande do Sul; to determine the prevalence of species; to evaluate their antimicrobial susceptibility profile; to check the presence of resistance and virulence related genes and; to analyse their genetic diversity. A total of 158 enterococci were identified as *E. faecalis* (55.7%), *E. faecium* (23.4%), *E. hirae* (15.2 %) and *E. casseliflavus* (5.7%). Most of the isolates were susceptible to the tested antimicrobials, however, resistance phenotypes were found for erythromycin (34.2%), rifampicin (32.9%) and tetracycline (0.63%). The erythromycin resistance gene *msrC* was detected in all *E. faecium* erythromycin resistant; moreover, the gene *erm* (B) was not detected. Only one sample was resistant to tetracycline, although it did not show any of the tetracycline resistant genes tested. Virulence genes *gelE* and *ace* (98.86%), *asa* (68.18%) and *cylA* (40.90%) were detected only in *E. faecalis*. The cytolysin and gelatinase activity was observed in 19 and 87 strains, respectively. Most enterococci were not able to form biofilm. The profile analysis generated by PFGE revealed a large number of clones. In conclusion, different species of enterococci were found in the microflora of sea turtle gastrointestinal tract and the presence of resistance and virulence determinants in these animals might be related to anthropogenic factors or even to an environmental resistome origin.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (154p.) march, 2016.



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xi	
LISTA DE FIGURAS .....	xiii	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xv	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1	Ambiente costeiro do Brasil e do Rio Grande do Sul .....	5
3.2	Tartarugas marinhas .....	10
3.2.1	<i>Chelonia mydas</i> (Linneus, 1758).....	16
3.2.2	<i>Eretmochelys imbricata</i> (Linneus, 1766).....	20
3.3	O Gênero <i>Enterococcus</i> .....	24
3.3.1	Taxonomia.....	24
3.3.2	Caracterização .....	26
3.3.3	Ecologia .....	26
3.3.4	Resistência.....	28
3.3.4.1	$\beta$ -lactâmicos .....	30
3.3.4.2	Aminoglicosídeos .....	30
3.3.4.3	Glicopeptídeos .....	31
3.3.4.4	Macrolídeos.....	32
3.3.4.5	Quinolonas .....	33
3.3.4.6	Cloranfenicol .....	34
3.3.4.7	Nitrofurantoína.....	34
3.3.4.8	Tetraciclina .....	35
3.3.4.9	Rifampicina.....	36
3.3.5	Genes de virulência.....	37
3.3.5.1	Citolisina.....	38
3.3.5.2	Gelatinase .....	40
3.3.5.3	Adesina colágeno.....	41
3.3.5.4	Substância de agregação.....	41
3.3.5.5	Biofilmes.....	42
3.3.6	Análise da diversidade genética pela técnica de PFGE .....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
4.1	Amostras .....	46
4.2	Coleta das amostras .....	47
4.3	Processamento das amostras: seleção e isolamento de enterococos .....	48
4.4	Hidrólise da esculina na presença de sais biliares .....	49
4.5	Produção da enzima catalase .....	49
4.6	Análise microscópica das células bacterianas .....	50

4.7	Preservação dos isolados bacterianos .....	50
4.8	Extração do DNA bacteriano .....	50
4.9	Confirmação do gênero por PCR .....	51
4.10	Identificação das espécies de por PCR.....	52
4.11	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	54
4.12	Detecção dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>erm(B)</i> e <i>msrC</i> relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina.....	55
4.13	Detecção de genes de virulência <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i> .....	57
4.14	Detecção da atividade da enzima gelatinase .....	59
4.15	Detecção da atividade da enzima citolisina.....	59
4.16	Avaliação da capacidade de formação de biofilme .....	60
4.17	Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
5.1	Isolamento de enterococos das amostras de fezes de tartarugas marinhas.....	66
5.2	Confirmação do gênero e identificação das espécies por PCR.....	68
5.3	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	73
5.4	Presença dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>erm(B)</i> e <i>msrC</i> relacionados a resistência bacteriana a tetraciclina e a eritromicina.....	80
5.5	Detecção de genes de virulência por PCR.....	83
5.6	Relação entre a presença do gene <i>gelE</i> e a produção da enzima gelatinase.....	87
5.7	Relação entre a presença do gene <i>cylA</i> e a atividade da citolisina... ..	89
5.8	Capacidade de formação de biofilme in vitro.....	91
5.9	Diversidade genotípica pela análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	95
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>139</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação taxonômica das tartarugas marinhas encontradas no Mundo.....	10
TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico ( <i>tuf</i> ) .....	51
TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR espécie-específicos ( <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. gallinarum</i> e <i>E. mundtii</i> ), temperatura de anelamento (TA) e tamanhos dos fragmentos gerados.....	53
TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>erm(B)</i> e <i>msrC</i> .....	56
TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>cylA</i> (citolisina), <i>gelE</i> (gelatinase), <i>ace</i> (adesina de colágeno) e <i>asa</i> (substância de agregação) .....	58
TABELA 6: Informações referentes às amostras utilizadas no estudo.....	67
TABELA 7: Distribuição de <i>Enterococcus</i> spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas.....	70
TABELA 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	74
TABELA 9. Distribuição dos genes de virulência <i>cylA</i> , <i>gelE</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i> nas diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	84
TABELA 10. Relação entre a presença do gene <i>gelE</i> e a atividade gelatinolítica entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	87
TABELA 11. Relação entre a presença do gene <i>cylA</i> e a atividade da enzima citolisina entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	89

TABELA 12. Capacidade de formação de biofilme das diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	92
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Limites da Zona Costeira e Marinha do Brasil. Disponível em: <http://www.naval.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2016.....5
- FIGURA 2: Ciclo de vida de tartarugas marinhas, disponível em: <http://www.tamar.org.br/interna.php?cod=90>. Acessado em: 20 jan. 2016....13
- FIGURA 3: Características fenotípicas empregadas na identificação da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) – Adaptado de MÁRQUEZ, 1990.....17
- FIGURA 4: Imagem de uma tartaruga-verde (*Chelonia mydas*). Fonte: Banco de dados TAMAR.....18
- FIGURA 5: Mapa de distribuição mundial de *Chelonia mydas*. A faixa verde no mapa representa a distribuição circunglobal das tartaruga-verdes nos mares tropicais entre as latitudes 40°S e 40°N. Fontes: SWOT e OBIS-SEAMAP.....18
- FIGURA 6: Distribuição geográfica da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Os pontos vermelhos no mapa representam áreas de alimentação, as áreas cinzas são áreas de ocorrência não reprodutivas os pontos verdes no mapa ampliado são as áreas de desova. Fonte: Banco de dados do TAMAR / SISTAMAR.....19
- FIGURA 7: Características fenotípicas empregadas na identificação de *Eretmochelys imbricata* - Adaptado de MÁRQUEZ, 1990.....21
- FIGURA 8: tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*). Fonte: Banco de dados TAMAR.....21
- FIGURA 9: Mapa de distribuição mundial de *Eretmochelys imbricata*. A faixa vermelha no mapa representa a distribuição circunglobal das tartarugas-de-pente nos mares tropicais entre as latitudes 30°S e 30°N. Fontes: SWOT e OBIS-SEAMAP.....22
- FIGURA 10: Distribuição geográfica da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Os pontos vermelhos e amarelos são as áreas de desova e os pontos verde e laranja são áreas de alimentação. Fonte: Banco de dados do TAMAR / SISTAMAR.....23
- FIGURA 11. Distribuição de espécies de enterococos da microbiota intestinal de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....69

FIGURA 12: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *Sma*I, do enterococos isolados das amostras T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8, demonstrando os 10 perfis clonais (PC).....97

FIGURA 13: Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de resistência dos isolados de tartarugas marinhas.....100

FIGURA 14: Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos do PFGE, genes de virulência, produção de gelatinase (GelE), produção de citolisina (CylA) e capacidade de formação de biofilme dos isolados de enterococos de tartarugas.....103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**μg**: microgramas  
**μL**: microlitro  
**Ace**: adesina de colágeno  
**Agg**: substância de agregação  
**AMP**: ampicilina  
**ATCC**: *American Type Culture Collection*  
**CDC**: *Centers for Disease Control and Prevention*  
**CECLIMAR**: Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos  
**CERAM**: Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos  
**CIP**: ciprofloxacina  
**CLO**: cloranfenicol  
**CLSI**: *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
**dNTP**: desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
**EDTA**: ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ERI**: eritromicina  
**Esp**: proteína de superfície de *Enterococcus*  
**EST**: estreptomicina  
**GeIE**: enzima gelatinase  
**GEN**: gentamicina  
**IUCN**: *International Union for Conservation of Nature*  
**MLST**: *Multi Locus Sequence Typing*  
**MLVA**: *Multiple-locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*  
**mM**: milimolar  
**ng**: nanogramas  
**NIT**: nitrofurantoína  
**NOR**: norfloxacina  
**PBP**: proteína de ligação de penicilinas  
**PCR**: Reação em Cadeia da Polimerase  
**PFGE**: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*  
**PYR**: L-pirrolidonil-β-naftilamida  
**RAPD**: *Random Amplified Polymorphic DNA*  
**rRNA**: ácido ribonucleico ribossomal  
**RIF**: rifampicina  
**Taq**: enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
**TE**: Tampão Tris-EDTA  
**TET**: tetraciclina  
**VAN**: vancomicina  
**VRE**: *Vancomycin-Resistant Enterococci*

## 1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro possui mais de 7,3 mil quilômetros de litoral, que se estende do Amapá ao estado do Rio Grande do Sul. A Zona Costeira do Brasil agrega ecossistemas de alta relevância ambiental que abrigam inúmeras espécies de animais e vegetais, endêmicas e exóticas. Nessa faixa litorânea ocorre o encontro de duas correntes marítimas importantes formando a chamada Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul Ocidental. Essas correntes marinhas são ricas em nutrientes e acabam contribuindo para o estabelecimento de uma diversidade de espécies marinhas na região.

Dentro dessa diversidade biológica estão incluídas as tartarugas marinhas. Atualmente, existem sete espécies de tartarugas marinhas espalhadas no mundo – todas ameaçadas de extinção – dessas, cinco espécies ocorrem no litoral do Brasil. As tartarugas marinhas usufruem da Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul Ocidental para alimentação e também como rota migratória para outras áreas de alimentação, reprodução e de desova. Ao longo da costa brasileira, há registros da presença desses animais, que são encontrados debilitados ou mortos, devido, principalmente, à ingestão de plásticos e outros resíduos encontrados nas águas e/ou pela interação com a pesca comercial, onde acabam sendo presos, acidentalmente, nas redes de pesca, ou ainda machucados pelas embarcações.

O gênero *Enterococcus* inclui, segundo evidências filogenéticas e



moleculares, mais de 50 espécies. Esse gênero apresenta uma natureza ubíqua que lhe permite sobreviver em diversos nichos ecológicos, sendo comensais da microbiota do trato gastrointestinal e geniturinário de seres humanos e outros animais. Os enterococos são reconhecidos pela capacidade intrínseca de possuir, adquirir e/ou transferir genes de resistência e virulência, que lhes facilitam a sobrevivência em condições adversas. A investigação dos perfis e mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana, bem como a identificação dos fatores de virulência relacionados a diversos nichos faz-se necessária, uma vez que tais estudos disponibilizariam informações a respeito das interações e distúrbios ambientais.

O ambiente marinho é um nicho ainda pouco explorado, mas vem despertando interesse pela possibilidade de abrigar novas espécies bacterianas. Há ainda uma escassez de estudos envolvendo enterococos e animais marinhos na natureza, possivelmente devido aos hábitos migratórios de algumas espécies, como as tartarugas, e pela dificuldade em se obter amostras desses ambientes.

O gênero *Enterococcus* está presente na microbiota de uma série de animais, e influencia diretamente a saúde e a ecologia desses. Contudo, ainda são necessários estudos que investiguem a presença desta bactéria em animais marinhos para fornecer subsídios para ações futuras que visem tanto a sua proteção como a do seu ambiente. Nesse sentido, o presente estudo buscou colaborar com o *status quo* do conhecimento científico sobre a microbiota gastrointestinal de animais marinhos ao examinar populações de enterococos isoladas de suabes cloacais de tartarugas marinhas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar e avaliar o resistoma dos enterococos aos antimicrobianos, detectar a presença de fatores de virulência e analisar a diversidade genética de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Isolar cepas pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. a partir de amostras fecais coletadas de tartarugas marinhas através de meios específicos para isolamento de bactérias pertencentes a este grupo;

2.2.2 Confirmar o gênero bacteriano por PCR empregando os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos para o gene *tuf*;

2.2.3 Identificar as espécies através de técnicas moleculares empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos;

2.2.4 Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e os mecanismos genéticos de resistência envolvidos;

2.2.5 Verificar a presença dos genes *cylA*, *gelE*, *ace* e *asa*, envolvidos na virulência de enterococos, e relacionar a presença desses genes com sua expressão fenotípica;

2.2.6 Avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* das diferentes espécies de enterococos;

2.2.7 Analisar a diversidade genética dos enterococos por meio de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, utilizando a técnica de PFGE.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Ambiente costeiro do Brasil e do Rio Grande do Sul

A Zona Costeira e Marinha do Brasil se estende da foz do rio Oiapoque (Amapá - AP) à foz do rio Chuí (Rio Grande do Sul - RS). Sua faixa terrestre se estende por aproximadamente 10.800 mil quilômetros ao longo da costa e possui uma área de aproximadamente 514 mil km<sup>2</sup>, conforme pode ser observado na Figura 1 (IBGE, 2016)

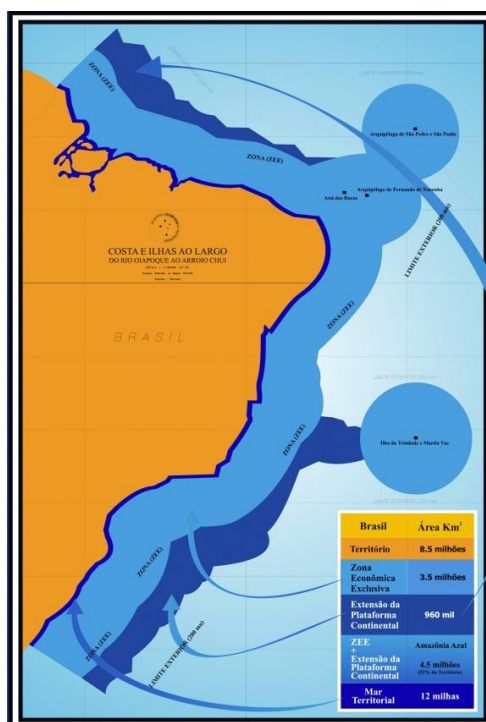


FIGURA 1. Limites da Zona Costeira e Marinha do Brasil. Disponível em: <http://www.naval.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2016.

A costa brasileira é uma das principais áreas de tráfego de riquezas do País que apresenta intensa atividade de comércio, transporte e exploração de petróleo. A região abrange 17 estados e sua faixa continental abriga 13 das 27 capitais brasileiras, incluindo algumas das principais regiões metropolitanas, onde vivem milhões de pessoas (IBGE, 2016).

A alta concentração populacional implica em alto grau de intervenção humana nos recursos naturais do bioma. Segundo dados da Comissão Interministerial para Recursos do Mar (CIRM), aproximadamente, um quarto da população brasileira vive na zona costeira, somando 50 milhões de habitantes (Moura et al., 2011; Turra & Denadai, 2015; CIRM, 2016).

A biodiversidade marinha presente na Zona Costeira é relativamente pouco conhecida. Muitas regiões, ecossistemas e ambientes ainda precisam ser estudados adequadamente (Barros et al., 2013). Ainda assim, o número de espécies de peixes catalogadas no bioma varia entre 705 e 1.209, considerando-se aquelas de áreas de estuário (BRASIL, 2016). Nos manguezais brasileiros podem ser encontradas espécies de peixes, aves, moluscos, plantas e artrópodes (Machado, 2006; Machado et al., 2008). Os mamíferos marinhos somam 57 espécies, só os cetáceos (baleias e golfinhos) chegam a 53. Mais de 100 espécies de aves estão associadas ao bioma costeiro e marinho, sendo algumas residentes e outras migratórias. Das sete espécies de tartarugas marinhas conhecidas no mundo, cinco vivem em águas brasileiras. O Brasil possui, ainda, os únicos recifes de coral do Atlântico Sul. Essa biodiversidade observada nas águas brasileiras deve-se à influência de três correntes oceânicas: das Guianas, do Brasil e das Malvinas (CECLIMAR,

2016).

O Litoral do Rio Grande do Sul ou Litoral Gaúcho se estende no sentido Norte–Sul por cerca de 620 quilômetros de costa retilínea, sendo dividido em quatro grandes setores: Litoral Norte (do município de Torres até o município de Cidreira), Litoral Médio Leste (de Palmares do Sul até São José do Norte), Litoral Médio Oeste (de Barra do Ribeiro até Pelotas) e Litoral Sul (do município de Rio Grande até Santa Vitória do Palmar) (FEPAM, 2016).

A costa litorânea desse estado apresenta uma grande riqueza biológica de espécies marinhas, devido ao encontro de correntes marítimas importantes - a Corrente das Malvinas e a Corrente do Brasil - que formam a chamada Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul Ocidental (CECLIMAR, 2016). O encontro dessas duas correntes, nessa região, somado à presença de ambientes estuarinos e diversos sangradouros contribuem para o aumento do aporte nutricional, atraindo, conseqüentemente, uma grande diversidade de animais marinhos. As tartarugas marinhas, por exemplo, utilizam o Litoral do Rio Grande do Sul como rota migratória e para alimentação. Contudo, a região não faz parte das áreas de reprodução e desova desses animais (Mäder, 2010; Moura et al., 2011).

Muitas tartarugas marinhas são encontradas já debilitadas ou mortas no litoral gaúcho (CECLIMAR, 2016). Dentre as principais ameaças a esses animais estão: a aquicultura, a pesca, o turismo, a expansão de áreas urbanas, as mudanças climáticas, entre outras (Moura et al., 2011; Turra & Denadai, 2015). Muitas tartarugas são vítimas da ingestão de plásticos e outros resíduos encontrados nas águas. Elas também sofrem pela interação com a pesca

comercial, onde acabam sendo presas, acidentalmente, pelas redes de pesca, ou ainda, mutiladas pelas embarcações (Rigon, 2012; Turra & Denadai, 2015).

A movimentação de navios de todo o mundo também contribui para o declínio da diversidade biológica marinha nativa, pois favorece a entrada de espécies exóticas, por meio da água de lastro das embarcações. Essas espécies invasoras disputam habitats e nutrientes com as espécies silvestres locais. Outra ameaça são os derramamentos de petróleo causados pelas operações de terminais marítimos (Zerbini et al., 1999; Pereira et al., 2008; BRASÍLIA, 2010; Moura et al., 2011; Turra & Denadai, 2015).

A contaminação das águas costeiras ocorre a partir de uma variedade de fontes, incluindo o despejo de esgotos residenciais, industriais e hospitalares. Essa situação é conhecida por proporcionar um habitat natural de micro-organismos patogênicos (Pereira et al., 2008). Além disso, alguns dos principais rios nacionais convergem para a Zona Costeira carreando resíduos de agrotóxicos e fertilizantes, o que torna essa região muito vulnerável aos impactos ambientais (Moura et al., 2011; WWF-Brasil, 2016).

Neste caso, o sistema aquoso funciona como uma via de transporte de poluentes microbiológicos, 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 à condição 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 animais 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 em cativeiro.

Os monitoramentos são a principal forma de obtenção de informações sobre ocorrência, biologia e ecologia da maioria das espécies de animais marinhos que encalham ou que repousam no litoral (Hays, 2008). A coleta de dados dos animais durante o período de recuperação, ou mesmo dos animais que são encontrados mortos, permite investigar e correlacionar diferentes áreas de estudo (CECLIMAR, 2016).

Alfonsi et al. (2013) investigaram o uso de técnicas moleculares como ferramentas rápidas para o monitoramento da biodiversidade de mamíferos marinhos encalhados na França. Recentemente, Santestevan et al. (2015) avaliou a relação filogenética entre enterococos isolados de duas espécies de lobos-marinhos. Prichula et al. (2016) sequenciou o genoma completo de um *Enterococcus faecalis* isolado das fezes de um pinguim-de-magalhães. 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; Veja-Munguía et al., 2015).



### 3.2 Tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas representam um componente primitivo e singular da diversidade biológica, sendo parte importante dos ecossistemas marinhos. Pertencem a mais antiga linhagem de répteis vivos, tendo aparecido pela primeira vez no Período Jurássico (Pritchard, 1997; Lee, 2013). O registro mais antigo de tartaruga marinha no mundo, datado de aproximadamente 110 milhões de anos, pertence à espécie *Santanachelys gaffneyi* (Protostegidae), encontrada no Ceará, Brasil (Hihayama, 1998; Lyson et al., 2013).

No Período Cretáceo havia quatro famílias de tartarugas marinhas: Toxochelyidae, Protostegidae, Cheloniidae e Dermochelyidae. Todos os gêneros e espécies surgiram no Período Eocênico e Pleistocênico, entre 60 e 10 milhões de anos. Atualmente, existem duas famílias, Cheloniidae e Dermochelyidae, seis gêneros e sete espécies, conforme Tabela 1.

TABELA 1: Classificação taxonômica das tartarugas marinhas encontradas no Mundo.

REINO	FILO	CLASSE	ORDEM	SUBORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE
Animalia	Chordata	Reptilia	Testudines	Cryptodira	Cheloniidae	<i>Caretta</i>	<i>Caretta caretta</i>
						<i>Chelonia</i>	<i>Chelonia mydas</i>
						<i>Eretmochelys</i>	<i>Eretmochelys imbricata</i>
						<i>Lepidochelys</i>	<i>Lepidochelys olivacea</i>
							<i>Lepidochelys kempii</i>
						<i>Natator</i>	<i>Natator depressus</i>
					Dermochelyidae	<i>Dermochelys</i>	<i>Dermochelys coriácea</i>

Das sete espécies existentes, cinco ocorrem no Brasil: *Dermochelys coriácea*, que pertence à família Dermochelyidae e as espécies *Caretta caretta*,

*Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, que pertencem à família Cheloniidae (BRASÍLIA, 2011).

Ao longo de sua evolução, várias modificações permitiram a sobrevivência e adaptação das tartarugas a novos ambientes. A carapaça tornou-se mais achatada, ficando mais leve e hidrodinâmica, e as patas transformaram-se em nadadeiras o que permitiu uma movimentação mais eficiente na água. Outra importante adaptação foi o surgimento de glândulas de sal, localizadas próximo aos olhos, utilizadas para a secreção de sal (Lutz & Musick, 1997; Lee, 2013; Lyson et al., 2013).

As tartarugas marinhas são animais altamente migratórios e de estilos de vida complexos (Hays & Scott, 2013). Esses animais distribuem-se amplamente entre as bacias oceânicas, com registros desde o Oceano Ártico até o Mar da Tasmânia (Meylan & Donnely, 1999; Goode-McCrink, 2014). Existem muitas teorias para explicar a capacidade das tartarugas marinhas em realizar migrações entre as áreas de alimentação, repouso e de reprodução (Lohmann et al., 1997).

Há evidências que as fêmeas adultas regressam à praia onde nasceram durante o seu período de reprodução (Lohmann et al., 1997; Lohmann et al., 2008). Alguns autores até sugerem que os filhotes possam memorizar a composição química da água e o campo magnético da terra ao apresentarem no cérebro cristais de magnetita, a pedra-ímã mais magnética da Terra (Musick & Limpus, 1997; Lohmann et al., 2012). Outros experimentos sugerem que as tartarugas marinhas sejam capazes de detectar o ângulo e a intensidade do campo magnético terrestre e determinar sua latitude e longitude, e, assim, sua

posição em mar aberto (Lohmann & Lohmann, 2006; Lohmann et al., 2012). Além disso, alguns estudos sugerem navegação mediante referencial de estrelas, sol, temperaturas oceânicas, correntes marinhas, características geológicas ou de padrões de ondas (Gulko & Eckert, 2004; Lohmann et al., 2012).

Os hábitos alimentares das tartarugas variam entre as espécies e em função do seu período de desenvolvimento, fatores comportamentais e ecológicos. As tartarugas marinhas podem ser herbívoras, carnívoras ou onívoras. Essas categorias podem mudar conforme a maturidade ou devido a adaptação a novos habitats. Animais jovens, geralmente, têm uma alimentação muito diferente dos adultos, por exemplo, as tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) jovens possuem uma dieta carnívora constituída de águas-vivas, quando adultas tornam-se herbívoras, alimentando-se de algas e ervas marinhas. A tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*) filhotes vivem em associação com bancos de algas do gênero *Sargassum*, alimentando-se, principalmente, de pequenos crustáceos. Já na fase jovem e adulta, tornam-se onívoras, alimentando-se de algas, crustáceos, moluscos, ouriços, corais e esponjas. As tartarugas-comuns (*Caretta caretta*) são onívoras, e se alimentam de animais e vegetais em sua dieta diária. Elas podem também alimentar-se de animais mortos (saprofíticas), ovos de peixes e até mesmo de lixo humano, fato esse que pode levar as tartarugas à morte (ANP, 1999).

A maior parte das ocorrências reprodutivas está concentrada em regiões tropicais e subtropicais (Márquez, 1990; Goode-McCrink, 2014). No Brasil, a temporada de desovas nas praias do continente ocorre, de forma

geral, durante os meses de Setembro a Abril; e de Dezembro a Junho nas ilhas oceânicas. A duração entre duas temporadas reprodutivas de uma mesma fêmea é denominada intervalo de remigração. Este período varia entre espécies e entre populações da mesma espécie, podendo ser alterado ao longo do tempo devido à disponibilidade de alimento, condições ambientais e distância entre áreas de alimentação e reprodução (BRASÍLIA, 2011).

Os ciclos reprodutivos, conforme Figura 2, podem variar de anuais a irregulares. As tartarugas apresentam maturação tardia e ciclo de vida longo, podendo, a depender da espécie, demorar de 10 a 50 anos para atingirem a maturidade sexual (Bjorndal & Zug, 1995; Chaloupka & Limpus, 1997; Meylan & Donnelly, 1999; Lee et al., 2007).

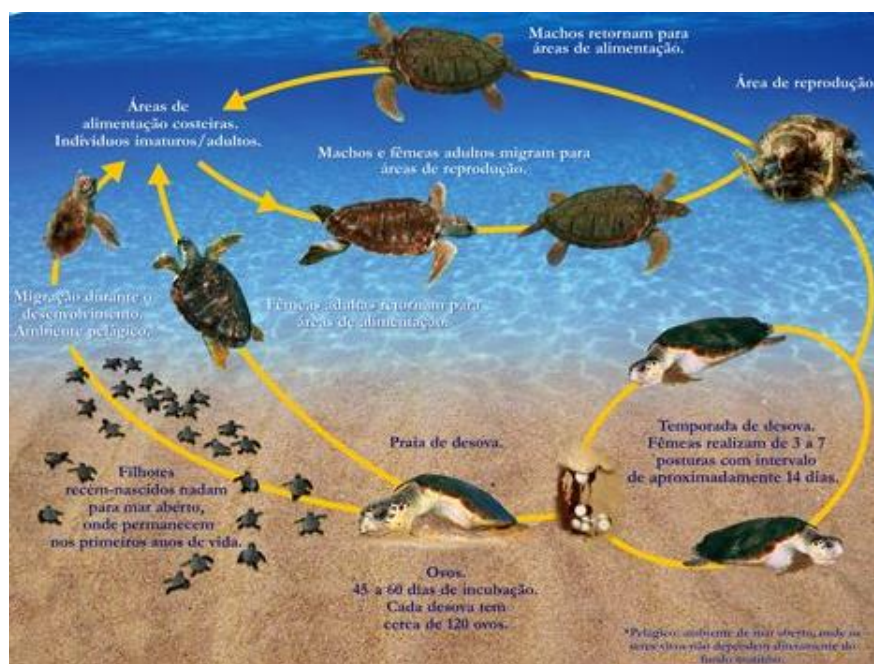


FIGURA 2: Ciclo de vida de tartarugas marinhas, disponível em: <http://www.tamar.org.br/interna.php?cod=90>. Acessado em: 20/01/2016.

A temperatura do ambiente é um fator muito importante no ciclo de vida das tartarugas marinhas, visto que tem influência direta na determinação

do sexo, no nascimento e crescimento dos filhotes, no tempo de incubação dos ovos, na distribuição geográfica, entre outros fatores (Mrosovsky, 1994; Weber et al., 2011). A proporção de sexos entre os filhotes é dependente da temperatura na qual os ovos são incubados – temperaturas mais altas produzem fêmeas; mais baixas, machos (Marcovaldi et al., 1997; Weber et al., 2011). Acredita-se que a tendência de aumento de temperatura global pode aumentar o número de fêmeas, tornando mais rara a presença de machos, o que pode inviabilizar o desenvolvimento dos embriões, além de outras interferências (Ackerman, 1997; Chaloupka et al., 2008).

Segundo Poloczanska et al. (2009), as tartarugas marinhas são vistas como vulneráveis às alterações climáticas, devido ao papel que a temperatura desempenha na determinação do sexo dos embriões. O aumento da temperatura na ordem de 2°C pode causar a feminização de toda uma população. Além disso, por se tratar de espécies de natureza altamente migratória, mudanças de disponibilidade de recursos alimentares, de circulação de correntes marinhas e de ventos podem comprometer seu longo e complexo ciclo de vida. No entanto, sobreviventes de mudanças climáticas no passado, incluindo os períodos glaciais e de aquecimento, estes animais têm demonstrado possuir alguma capacidade adaptativa a estes eventos (Chaloupka et al., 2008).

Atualmente, todas as sete espécies de tartarugas marinhas estão incluídas nas listas de animais ameaçados de extinção em escala mundial (IUCN, 2016). A interferência humana em escala global é uma das principais causas do colapso das populações de tartarugas. As atividades humanas

impactam todos os estágios do ciclo de vida das tartarugas, desde a perda de áreas de desova e alimentação até a mortalidade na costa; e em alto mar pela prática intensa da pesca. Também são ameaçadas por uma carga de resíduos não biodegradáveis e poluentes que os oceanos e zonas costeiras recebem (Lutcavage et al., 1997; IUCN, 2016; Machado, 2008).

A extração de areia e o aterro das praias alteram as características físicas dos locais de desova das tartarugas marinhas, modificando a temperatura de incubação, interferindo na proporção sexual e na sobrevivência dos ovos. Isso inviabiliza a utilização da praia pelas fêmeas e reduz as áreas disponíveis para nidificação. No Brasil, esta ameaça está presente em áreas destinadas a construções portuárias e em orlas com crescimento turístico (BRASÍLIA, 2011).

A poluição luminosa, decorrente de instalações humanas, alteram o comportamento noturno das tartarugas marinhas, em especial a forma como esses animais selecionam seus locais de desovas e como os filhotes localizarão o mar após a emersão dos ninhos (Witherington & Martin, 1996; Davies et al., 2014). Já o trânsito de veículos, apresenta risco de atropelamento de fêmeas e filhotes, pode compactar os ninhos dificultando o seu nascimento. Além disso, as marcas de pneus dificultam o acesso dos filhotes ao mar e a presença de pessoas em áreas de desova gera ruídos que podem afetar o comportamento reprodutivo das tartarugas marinhas (Lohmann et al., 1997).

Desse modo, há diferentes formas de poluição que constituem uma ameaça para os habitats marinhos e terrestres das tartarugas marinhas que incluem som, temperatura, luz, plásticos, produtos químicos, efluentes entre

outros. Estudos têm demonstrado o efeito potencial dos poluentes sobre as tartarugas marinhas (Hutchinson & Simmonds, 1991; Hutchinson & Simmonds, 1992), em especial dos resíduos sólidos (Carr, 1987; Bugoni et al., 2001; Tomás et al., 2002; Mrosovsky et al., 2009; Rigon, 2012), dos restos de materiais de pesca descartados (Chatto et al., 1995; Leitch, 2001; Monagas et al., 2008), dos metais pesados (Godley et al., 1999; Maffucci et al., 2005; Guirlet et al., 2008; Garcia-Fernández et al., 2009), dos pesticidas organoclorados (Keller et al., 2006; Ikonopoulou et al., 2009), da poluição por hidrocarbonetos (Chan & Liew, 1988), dos fluídos, dos efluentes associados a atividade petrolífera e da poluição por esgotos (Shigenaka, 2003; Rigon, 2012).

É importante salientar também que tem aumentado o número de espécies de tartarugas híbridas. Um estudo realizado no Litoral Norte da Bahia, com 119 animais mostrou que 44% do total das tartarugas analisadas são híbridas, sendo 42% oriundas do cruzamento entre *E.imbricata* e *Caretta caretta* e 2% do cruzamento entre *E. imbricata* e *Lepidochelys olivacea* (Lara-Ruiz et al., 2006). Ainda não são compreendidas as causas e implicações da hibridação e seu impacto na diversidade genética, taxonomia e conservação destas espécies (Lara-Ruiz et al., 2006; Bowen & Karl, 2007; Reis et al., 2009b; Vilaça & Santos, 2013).

### **3.2.1 *Chelonia mydas* (Linneus, 1758)**

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas* – Linnaeus, 1758) possui a carapaça com quatro pares de placas laterais justapostas (conforme Figura 3),

nos animais adultos, do Brasil, tem medida curvilínea média de 115,6 cm de comprimento (Grossman, 2001; Moreira, 2003). A cabeça possui um par de placas (ou escudos) pré-frontais e quatro pares de escudos pós-orbitais (Márquez, 1990).

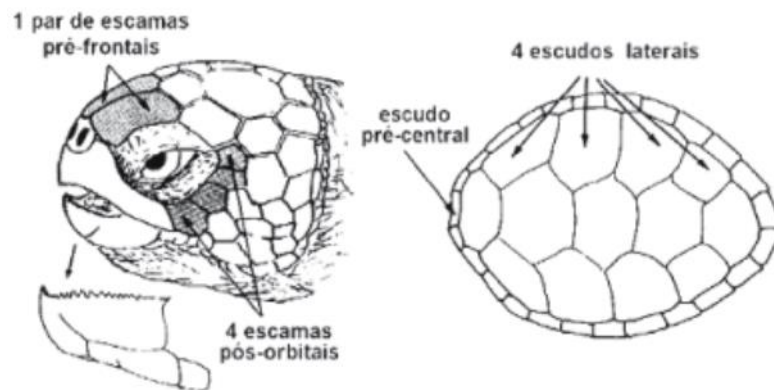


FIGURA 3: Características fenotípicas empregadas na identificação da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) – Adaptado de MÁRQUEZ, 1990.

Essa espécie possui coloração verde-acinzentada (Figura 4) e o ventre é branco nas populações do Oceano Atlântico. Os exemplares encontrados no Oceano Atlântico e Pacífico Oriental podem atingir aproximadamente 230 kg, sendo mais leves que aqueles do Oceano Índico e do Caribe (Pritchard & Mortimer, 1999).





FIGURA 4: Imagem de uma tartaruga-verde (*Chelonia mydas*). Fonte: Banco de dados TAMAR.

A tartaruga-verde tem distribuição circungalbal, ocorrendo nos mares tropicais (Hirth, 1997). No Oceano Atlântico, os principais sítios reprodutivos estão localizados na Costa Rica, ilha de Ascensão no Reino Unido, Guiné-Bissau, México, Suriname e ilha de Trindade no Brasil (Figura 5) (Broderick et al., 2006; TAMAR, 2016).



FIGURA 5: Mapa de distribuição mundial de *Chelonia mydas*. A faixa verde no mapa representa a distribuição circungalbal das tartaruga-verdes nos mares tropicais entre as latitudes 40°S e 40°N. Fontes: SWOT e OBIS-SEAMAP.

A atividade reprodutiva da *C. mydas* é semelhante nas três áreas de

desova oceânicas, iniciando no mês de Dezembro e prolongando-se até Maio ou Junho (Grossman, 2001; Grossman et al., 2003; Almeida et al., 2011). As principais áreas de desova no Brasil estão localizadas em ilhas Oceânicas: Ilha da Trindade (Espírito Santo) (Moreira et al., 1995), Reserva Biológica do Atol das Rocas (Rio Grande do Norte) (Bellini et al., 2000; Grossman et al., 2003) e Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco) (Bellini & Sanches, 1996) (Figura 6).

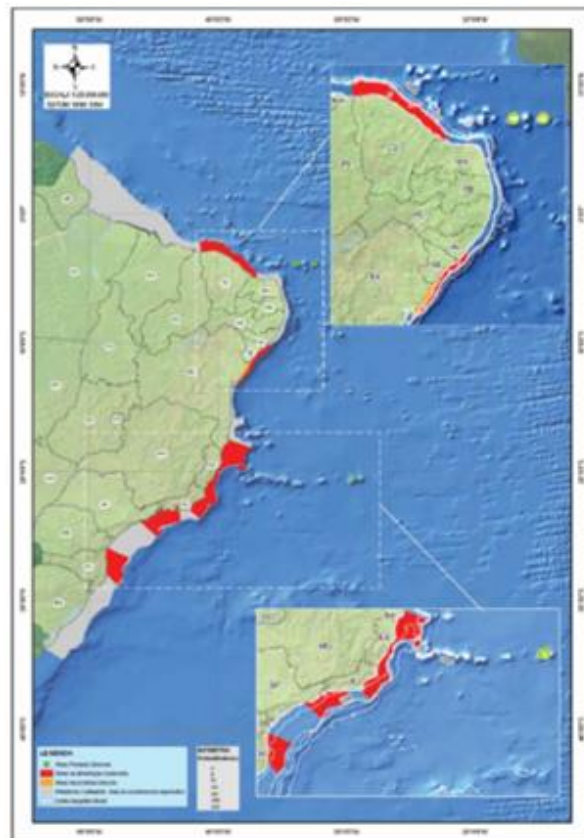


FIGURA 6: Distribuição geográfica da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Os pontos vermelhos no mapa representam áreas de alimentação, as áreas cinzas são áreas de ocorrência não reprodutivas os pontos verdes no mapa ampliado são as áreas de desova. Fonte: Banco de dados do TAMAR / SISTAMAR.

As tartarugas-verdes juvenis são muito comuns na região costeira do

Brasil; uma vez que, esta é a espécie com maior número de ocorrências registrada de encalhes, avistagens, capturas incidentais em pesca (Pritchard, 1976; Mascarenhas et al. 2003; Brito et al., 2004; Gallo et al., 2006; Silva, 2006; Reis et al., 2009a; TAMAR, 2016). Além das ilhas oceânicas: Trindade, Fernando de Noronha e Atol das Rocas (TAMAR, 2016) há registros de captura incidental de *C. mydas* em atividades de pesca na Lagoa dos Patos e no Litoral Norte do Rio Grande do Sul (Figura 6) (Soto & Beheregaray, 1997; Silva, 2006, CECLIMAR, 2016). De acordo com a IUCN (2004) as tartarugas-verdes estão classificadas como “em perigo” (“endangered”). No Brasil, estão classificadas como vulnerável na Avaliação do Estado de Conservação elaborado para esta espécie, com base nos dados disponíveis até 2009 (Almeida et al., 2011).

### **3.2.2 Eretmochelys imbricata (Linneus, 1766)**

A tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata* – Linnaeus, 1766) possui a carapaça com quatro pares de placas laterais sobrepostas, de coloração marrom; a cabeça possui dois pares de placas (ou escudos) pré-frontais e três pares de pós-orbitais; o ventre é amarelo claro (Márquez, 1990) (Figuras 7 e 8). A medida curvilínea média da carapaça nas principais áreas de desova no mundo varia entre 76,8 e 97,4 cm de comprimento (Marcovaldi et al., 1999) e o peso gira em torno de 80 kg (Pritchard & Mortimer, 1999).

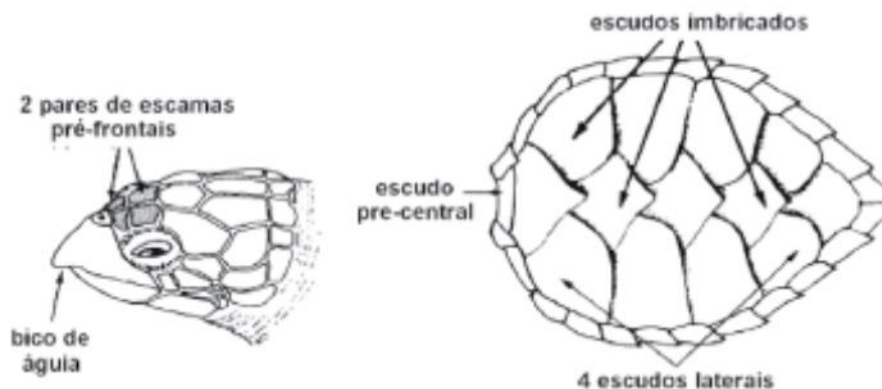


FIGURA 7: Características fenotípicas empregadas na identificação de *Eretmochelys imbricata* - Adaptado de MÁRQUEZ, 1990.



FIGURA 8: tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*). Fonte: Banco de dados TAMAR.

A tartaruga-de-pente tem distribuição circunglobal em águas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico, Índico e Pacífico (Figura 9). É considerada a mais tropical de todas as espécies de tartarugas marinhas (Márquez, 1990). No Atlântico, os principais sítios reprodutivos estão localizados em diferentes regiões do Caribe e no Brasil (Mortimer, 2007).

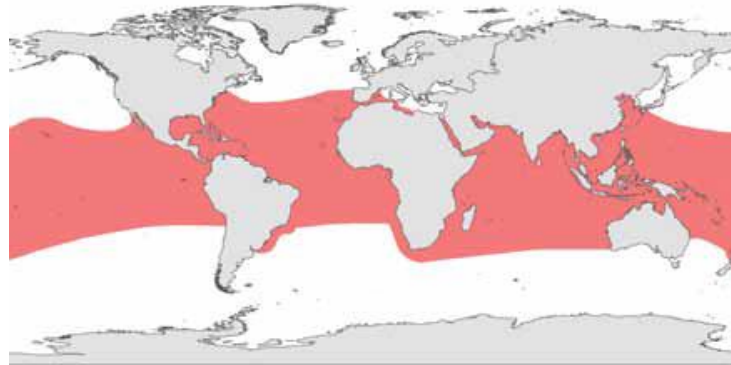


FIGURA 9: Mapa de distribuição mundial de *Eretmochelys imbricata*. A faixa vermelha no mapa representa a distribuição circungalbal das tartarugas-de-pente nos mares tropicais entre as latitudes 30°S e 30°N. Fontes: SWOT e OBIS-SEAMAP.

A principal área de desova de *E. imbricata* no Brasil está localizada no norte da Bahia e em Sergipe, com uma área importante no litoral sul do Rio Grande do Norte (Marcovaldi et al., 2007). Existem áreas com número menor de desovas, como na Paraíba, na região de Porto Seguro e no litoral sul baiano (Figura 10) (Mascarenhas et al., 2003; Mascarenhas et al., 2004; TAMAR, 2016).

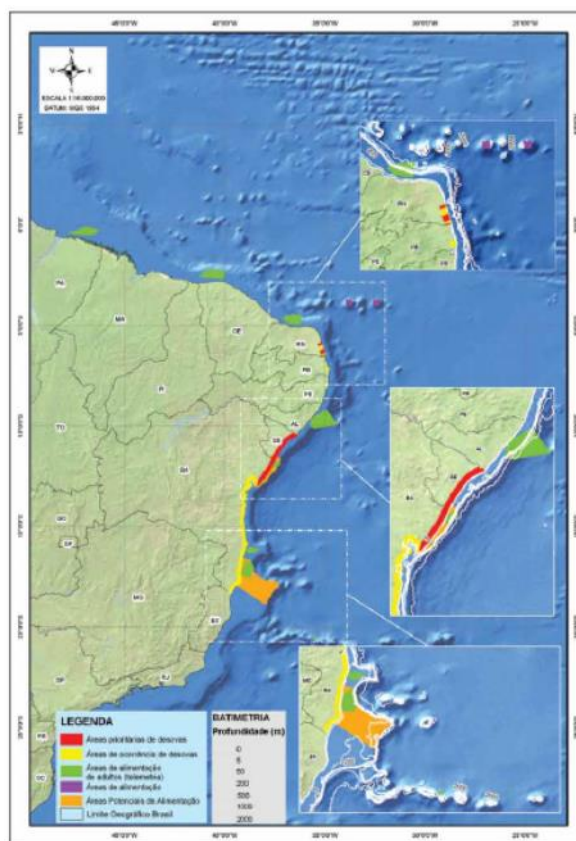


FIGURA 10: Distribuição geográfica da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Os pontos vermelhos e amarelos são as áreas de desova e os pontos verde e laranja são áreas de alimentação. Fonte: Banco de dados do TAMAR / SISTAMAR.

Em diversos estados do Brasil, como no Rio Grande do Sul (Pinedo et al., 1998; Monteiro, 2004; Silva, 2006); Santa Catarina (TAMAR, 2016); São Paulo (Gallo et al., 2006); Rio de Janeiro (Reis et al., 2009a); Espírito Santo (TAMAR, 2016); Bahia (Coelho, 2009; TAMAR, 2016); Sergipe, Rio Grande do Norte, Fernando de Noronha e Ceará (Lima et al., 2011; TAMAR, 2016), existem registros de encalhes e capturas incidentais por pescarias.

De acordo com a IUCN, 2008 as tartarugas marinhas da espécie *E.imbricata* estão classificadas como “criticamente em perigo” (“critically endangered”). No Brasil, estão classificadas como criticamente em perigo na Avaliação do Estado de Conservação elaborado para esta espécie, com base

nos dados disponíveis até 2009 (Marcovaldi et al., 2011).

### **3.3 O Gênero *Enterococcus***

Os enterococos compõem um grupo de micro-organismos altamente adaptados a ambientes complexos e capazes de sobreviver em condições adversas (Gilmore et al., 2013). Seu perfil taxonômico sofreu alterações relevantes nas últimas décadas, sendo atualmente consideradas 54 espécies distintas com vários habitats, tropismos e características metabólicas e fenotípicas (Euzéby, 2016). Dentre 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).

#### **3.3.1 Taxonomia**

Em 1899, o termo "entérocoque" foi utilizado pela primeira vez por Thiercelin, a fim de descrever um micro-organismo diplococo Gram-positivo de origem intestinal. 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 (Diebel, 1964; Facklam, 1972; Murray,

1990; Lebreton et al., 2014; Ševc & Franz, 2014; Euzéby, 2016).

Este gênero 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 com embasamento nas características bioquímicas, bem como nos 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; Ševc & Franz, 2014).

Os enterococos compõem a família *Enterococcaceae*, juntamente com *Bavariicoccus*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (Ludwig et al., 2009; Euzéby, 2016). A comparação entre sequências de DNA permanece sendo a metodologia padrão-ouro para o estabelecimento de espécies bacterianas e essa verificação já 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 *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*, que são 99,9% semelhantes por este critério (Facklam et al., 2002).



### 3.3.2 Caracterização

Os enterococos são cocos Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, arranjados aos pares, em cadeias curtas ou ainda como células únicas. Esses micro-organismos são capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares, crescem em meio de cultura contendo 6,5% de cloreto de sódio, toleram variações de pH (4,5 – 10,0) e temperatura (10 – 45°C), são capazes de se adaptar às mais diversas condições ambientais (Murray, 1990; Teixeira et al., 2011; Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

Os *Enterococcus* spp. apresentam crescimento rápido em meios de cultura enriquecidos após 24 horas de incubação. As colônias são, em geral, brancas ou amareladas, não hemolíticas, apresentando raramente casos de alfa ou beta-hemólise. Algumas provas bioquímicas específicas ajudam na identificação das espécies de enterococos, tais como as reações de fermentação de carboidratos (L-arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP), D-rafinose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose) sem produção de gás, hidrólise da arginina, da leucina- $\beta$ -naftilamina, da L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida, motilidade e produção de pigmento (Murray, 1990; Teixeira et al., 2011, Ramsey et al., 2014).

### 3.3.3 Ecologia

Os *Enterococcus* spp. apresentam características peculiares que

têm contribuído para a sua adaptabilidade e a ampla distribuição na natureza. O gênero inclui, atualmente, 54 espécies (Euzéby, 2016), sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* conhecidas como as espécies mais frequentemente portadoras de fatores de virulência. Algumas espécies apresentam colônias pigmentadas, tais como *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus* e *Enterococcus mundtii*. Outras espécies apresentam motilidade, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Há espécies capazes de hidrolisar a L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR) como *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus comumbae* e *Enterococcus pallens*, e espécies que pertencem ao grupo Q de Lancefield, como *Enterococcus avium*, entre outras espécies que constituem esse gênero (Gilmore et al., 2013).

A capacidade intrínseca que apresentam de adquirir e transferir genes de resistência aos antimicrobianos e/ou de virulência é uma outra característica desse gênero. Esses genes são dissemináveis através de elementos extracromossômicos ou via conjugação conferindo-lhes vantagens para sua sobrevivência e disseminação no ambiente como um todo (Fisher & Phillips, 2009; Byappanahalli et al., 2012). A análise do genoma dos enterococos tem destacado, também, a vantagem adaptativa dessas bactérias em adquirir nutrientes necessários para o seu crescimento e sua sobrevivência em diferentes habitats (Gilmore et al., 2013). Além disso, de acordo com a Resolução nº 274 de 2000, enterococos são indicadores específicos para contaminação de águas marinhas. Cada local do corpo colonizado por enterococos representa um ecossistema que é definido por características únicas, constituindo um ambiente competitivo e seletivo para micro-organismos

adaptados (Murray, 1990; Lebreton et al., 2014).

### **3.3.4 Resistência**

Os enterococos são conhecidos por possuir um perfil de resistência múltipla aos antimicrobianos, esse fenômeno está relacionado à existência de genes codificadores de mecanismos que são capazes de alterar a ação de substâncias antimicrobianas, podendo ser observada tanto a resistência intrínseca, quanto a resistência adquirida (Tavares, 2000).

A elevação do número de linhagens resistentes, devido uma pressão seletiva, tem sido relacionada ao aumento observado no uso de antimicrobianos nas áreas clínica, tanto humana quanto veterinária; industrial, na conservação de alimentos; e também comercial, como promotor de crescimento em animais e experimental (Tavares, 2000; Turnidge, 2004; Lebreton et al., 2014).

No entanto, estações de tratamento de água, esgoto doméstico e hospitalar, sedimentos, águas superficiais, rios, lagos e oceanos podem ser considerados como importantes reservatórios de enterococos resistentes (Caumo et al., 2010; Lebreton et al., 2014), uma vez que 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, pois a redução do número de bactérias não é suficiente para evitar a difusão por córregos, rios e oceanos (Nachtigall et al., 2013). Nesse sentido, também considera-se, atualmente, inevitável a presença

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

O ecossistema marinho tem sido alvo de estudos envolvendo *Enterococcus* spp. Em 2006, Moore et al. 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. Logo, a investigação de micro-organismos da água pode ser uma ferramenta bastante conveniente na compreensão dos mecanismos de resistência a antimicrobianos (Caumo et al., 2010).

As várias características intrínsecas expressas por enterococos incluem resistência a cefalosporinas, sulfonamidas e baixos níveis a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e clindamicina. Exemplos de resistência adquirida incluem a resistência a cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, fluoroquinolonas, glicopeptídeos e altos níveis de aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (Fisher & Phillips, 2009). Outro mecanismo de resistência detectado em enterococos é a mutação no gene da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, em particular a mutação *rpoB* H486Y, que confere resistência a rifampicina. Para tal fim, serão

discutidas a seguir as características relacionadas aos mecanismos de ação e à resistência das classes de antimicrobianos avaliados no estudo.

#### **3.3.4.1 $\beta$ -lactâmicos**

O gênero *Enterococos* apresenta uma resistência relativa aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que essa resistência varia entre as diferentes classes de  $\beta$ -lactâmicos e entre as espécies de enterococos. A suscetibilidade aos  $\beta$ -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 (Murray, 1990).

Cefalosporinas e carbapenêmicos apresentam estruturas semelhantes e ação análoga, porém possuem atividade antimicrobiana menor frente aos enterococos, quando comparado com a ação da ampicilina, cujo efeito é o mais efetivo entre as penicilinas (Murray, 1990; Shepard & Gilmore, 2002a). A produção de  $\beta$ -lactamases ou modificações estruturais nas PBP's, aumentam a resistência desses micro-organismos, tornando-os menos suscetíveis à inibição pelos antimicrobianos dessa classe (Murray, 1990; Kristich et al., 2014).

#### **3.3.4.2 Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos têm um efeito bactericida, pois ligam-se irreversivelmente à porção 16S rRNA da subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do RNA e,

consequentemente, interrompendo a síntese de proteínas. Os enterococos são intrinsecamente resistentes a baixos níveis de aminoglicosídeos, tais como estreptomicina e gentamicina, que são os principais antimicrobianos de amplo espectro dessa classe (Murray, 1990; Guimarães et al., 2010).

O nível de resistência varia entre os diferentes aminoglicosídeos e está associado à baixa permeabilidade da parede celular dos enterococos a estas moléculas, o que provoca a redução da sua entrada na célula bacteriana. Entretanto, a associação do aminoglicosídeo com um antimicrobiano com ação sobre a parede celular, como por exemplo, glicopeptídeo ou  $\beta$ -lactâmico, resultará em um efeito sinérgico bactericida (Murray, 1990 Tavares, 2000).

Apesa disso, estratégias adotadas pelos micro-organismos levaram ao surgimento de estirpes com resistência a altos níveis de aminoglicosídeos, mesmo frente ao sinergismo. Essa resistência adquirida a estreptomicina e gentamicina ocorre devido à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como fosfotransferases, nucleotidiltransferases e acetiltransferases. Estas enzimas levam à perda do sinergismo, diminuem o efeito bactericida no tratamento de infecções por enterococos e culmina na resistência a altos níveis destes antimicrobianos (Shepard & Gilmore, 2002a; Kristich et al., 2014).

### **3.3.4.3 Glicopeptídeos**

Antimicrobianos como a vancomicina e teicoplanina tornaram-se os fármacos de primeira linha no tratamento de infecções por bactérias Gram-

positivas com perfil de multirresistência. A resistência a esses glicopeptídeos são um problema dentro de hospitais, visto que é uma das principais causas de aumento nos custos das internações e nos casos de mortalidade (Cattoir & Leclercq, 2013; CDC, 2013; Kristich et al., 2014). No Brasil, o primeiro relato de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) ocorreu na cidade de Curitiba. Desde então, cepas com esse fenótipo têm sido isoladas de diferentes fontes (d'Azevedo et al., 2006; Fracalanza et al., 2007; Riboldi et al., 2009).

Os glicopeptídeos atuam inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana pela ligação de alta afinidade com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem a parede celular (Guimarães et al., 2010). A resistência a essa classe de antimicrobianos ocorre devido a uma alteração no alvo de ligação D-alanil-D-alanina por D-alanil-D-lactato, que produz níveis elevados de resistência ou para D-alanil-D-serina, que produz níveis baixos de resistência. Isso faz com que a afinidade pelo glicopeptídeo diminua e interfira no mecanismo de ação desses fármacos (Tavares, 2000; Cattoir & Leclercq, 2013). Nove fenótipos de resistência a glicopeptídeos já foram descritos em enterococos, sendo cada tipo associado a diferentes elementos gênicos (Kristich et al., 2014).

#### **3.3.4.4 Macrolídeos**

Eritromicina, claritromicina e azitromicina fazem parte deste grupo. A ação bacteriostática desses antimicrobianos ocorre pela inibição da síntese de proteínas, em decorrência da ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S do micro-organismo (Murray, 1990; Guimarães et al., 2010). Os dois

principais mecanismos de resistência envolvendo isolados de enterococos são: a modificação no sítio-alvo de ação do antimicrobiano devido a uma metilação na subunidade 23S rRNA codificadas pelos genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* ou *erm(TR)*; ou um sistema de bomba de efluxo mediada pela proteína ligada à membrana, codificada pelos genes *mef (A/E)*, *msrA*, *msrC* ou *mreA* (Zou et al., 2011).

Plasmídeos e transposons contendo genes de resistência à eritromicina são comumente encontrados em enterococos. O gene *erm(B)* é o mais prevalente distribuído em enterococos isolados de humanos e animais, sendo responsável por parte do fenótipo de resistência a macrolídeos-lincosamida-estreptogramina B nesses hospedeiros (Murray, 1990; Kristch et al., 2014).

#### **3.3.4.5 Quinolonas**

Ciprofloxacina e norfloxacina são fármacos bactericidas representantes dos mais de vinte exemplares que integram esta classe. 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; Guimarães et al., 2010).

A resistência às quinolonas, de um modo geral, pode decorrer de: mutações pontuais nas sequências de DNA das enzimas, que impedem a ligação eficiente do antimicrobiano com a enzima; alteração da permeabilidade



da membrana celular; atuação de bombas de efluxos que retiram a droga do interior da célula, impedindo a ação do composto (Jackson et al., 1998; Nordmann & Poirel, 2005). Além disso, um novo mecanismo de resistência às quinolonas foi recentemente relatado, sugerindo que a presença de proteínas da família Qnr, cuja função ainda não é muito clara, poderia estar protegendo as topoisomerasas da ação das quinolonas (Kristich et al., 2014).

#### **3.3.4.6 Cloranfenicol**

A ação bacteriostática deste antimicrobiano ocorre através da inibição da síntese proteica, pela ligação à subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a ação da enzima peptidiltransferase (Guimarães et al., 2010). Nos enterococos, a resistência ao cloranfenicol está relacionada, principalmente, ao gene *cat*, presente no cromossomo ou em plasmídeos, que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase que é capaz de acetilar um grupamento hidroxila na molécula do antimicrobiano de forma a perder a capacidade de ligação ao ribossomo (Murray, 1990).

#### **3.3.4.7 Nitrofurantoína**

A nitrofurantoína possui atividade antibacteriana e é utilizada comumente na medicina veterinária e humana por apresentar amplo espectro de ação e baixa capacidade de seleção de bactérias resistentes. Além disso, devido ao seu amplo espectro de ação, também é adicionada à alimentação animal para prevenir e tratar infecções gastrointestinais.

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). Esse antimicrobiano age inibindo vários mecanismos enzimáticos bacterianos, como a acetilcoenzima A, ou pela interrupção da síntese da parede celular, interferindo, assim, na síntese de proteínas essenciais para o micro-organismo (Masunari & Tavares, 2006).

#### **3.3.4.8 Tetraciclina**

As tetraciclinas possuem ação bacteriostática de amplo espectro e bastante eficazes frente a diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação ocorre pela ligação do antimicrobiano, de maneira reversível, à subunidade 30S do ribossomo, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo. Como resultado, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada e a liberação de proteínas é inibida (Guimarães et al., 2010).

A resistência à tetraciclina, presente em enterococos, pode ocorrer por determinação cromossomal ou mediada por plasmídeos e transposons. Dentre os mecanismos de resistência observados, destacam-se o efluxo da droga através da membrana, mediada por genes como *tet(K)* e *tet(L)*; e a alteração conformacional do ribossomo pelos genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)*, que dificultam a ligação do antimicrobiano com o seu sítio-alvo (Murray, 1990, Bentorcha et al., 1991; Frazzon et al., 2010).

### 3.3.4.9 Rifampicina

O primeiro antibiótico da família das ansamicinas, a rifampicina, foi isolada em 1959, e introduzido em terapia em 1962. Ainda hoje a rifampicina é considerada um agente de primeira linha para o tratamento de doenças causadas pelo *Mycobacterium* spp., tais como tuberculose, lepra e em infecções relacionadas com a formação de biofilme. Adicionalmente, apresenta amplo espectro frente a bactérias Gram-positivas, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* multirresistente e uma ação menor contra bactérias Gram-negativas (Tupin et al., 2010).

O mecanismo de ação ocorre devido à inibição da RNA polimerase da bactéria. O fármaco se liga a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e bloqueia o início da transcrição. Na maioria das bactérias, a resistência à rifampicina é mediada através de mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase o que obriga o uso de rifampicina em combinações com outros fármacos, tais como isoniazida, bem como a limitação do seu uso para o tratamento da tuberculose e em situações de emergência (Enne et al., 2004; Tupin et al., 2010; Alifano et al., 2015). Tais mutações têm sido descritas em uma ampla variedade de organismos, incluindo *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* (Andrews et al., 2000; Enne et al., 2004; Tupin et al., 2010; Angst & Hall, 2013; Domingues et al., 2015).

Outros mecanismos de resistência foram relatados, tais como a duplicação do alvo, a ação de proteínas de ligação na RNA polimerase e a modificação de permeabilidade celular. Entretanto, muitas vezes, os

mecanismos de resistência encontrados na clínica têm uma origem ambiental. A introdução da rifampicina e seus análogos no arsenal terapêutico, bem como a diversificação das patologias tratadas por essas moléculas, pode vir a diversificar os mecanismos de resistência dos patógenos humanos contra esta classe de antimicrobianos (Tupin et al., 2010; Alifano et al., 2015).

Embora a rifampicina não seja rotineiramente usada para tratar infecções causadas por enterococos, a resistência adquirida tem sido comumente relatada na literatura. Andrews (2000) avaliou 28 centros de pesquisas e hospitais-escolas, durante dois anos e encontrou *E.faecalis* e *E.faecium* resistentes a rifampicina. Um estudo com 71 isolados *E.faecium* de hospitais do Reino Unido descobriram que 78,9% eram resistentes à rifampicina (Enne et al., 2004). Schwaiger et al. (2011) isolou *E.faecalis* resistentes a rifampicina de vegetais comercializado em um supermercado na Alemanha.

### **3.3.5 Genes de virulência**

Genes de virulência são genes codificadores de proteínas que desempenham um papel fundamental na patogenicidade dos enterococos, proporcionando-lhes uma vantagem seletiva sobre outros micro-organismos. A aquisição de fatores de virulência, assim como as características intrínsecas de resistência, permite que as bactérias consigam sobreviver e se reproduzir mesmo em ambientes competitivos (Mundy et al., 2000). A aderência ao tecido do hospedeiro, a invasão e a formação de abscesso, a modulação da resposta inflamatória e a secreção de produtos tóxicos são características que

determinam a virulência (Eaton & Gasson, 2001; Mannu et al., 2003).

Os enterococos não apresentam os potentes fatores de virulência encontrados em muitas bactérias Gram-positivas patogênicas, tais como *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Entretanto, apresentam características importantes que contribuem para sua virulência e que os tornam patógenos oportunistas com grande expressão e representatividade nas áreas médica e veterinária e na indústria alimentícia e ambiental (Fracalanza, 2007). Além disso, pode-se dizer que a virulência, em suas diversas formas, desempenha um papel importante na promoção da persistência de enterococos no ambiente e, conseqüentemente, contribuem para sua disseminação (Camargo et al., 2008).

O gênero *Enterococcus* possui vários fatores de virulência já identificados, encontrados tanto no cromossomo bacteriano quanto em elementos extracromossomais, como plasmídeos e transposons. A citolisina, a adesina de colágeno, a gelatinase e a substância de agregação estão entre as principais moléculas associadas à virulência em enterococos (Mundy et al., 2000; Eaton & Gasson, 2001; Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2004; Medeiros, 2011; Johansson & Rasmussem, 2013). *Enterococcus faecalis* é a espécie de enterococos que apresenta a maior incidência de fatores de virulência, o que reforça a evidência da patogenicidade (Medeiros, 2011).

#### **3.3.5.1 Citolisina**

A citolisina é uma substância proteica com atividade hemolítica em sangue humano, de coelho e de cavalo, mas não possui atividade hemolítica

frente ao sangue de carneiro, que é frequentemente usado em laboratórios de microbiologia clínica (Mundy et al., 2000). 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 (Coburn & Gilmore, 2003; Golińska et al., 2013).

Muitos estudos destacam a atividade citolítica em infecções causadas por *E. faecalis*, porém esta característica não é exclusiva de isolados clínicos e tampouco está associada apenas a esta espécie, dado que Semedo et al. (2003) identificaram genes relacionados à atividade hemolítica de linhagens de enterococos obtidos de amostras clínicas humanas e veterinárias com origem infecciosa, mas também a partir de alimentos como queijo e leite.

Classificada como um Lantibiótico do tipo A, a citolisina é codificada por um operon composto de oito genes: *cyLL*, *cyLS*, *cyIA*, *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).

Apesar da 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 tem apontado sua influência sobre a patogênese. 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; Golinska et al., 2013).

### 3.3.5.2 Gelatinase

A gelatinase é 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 o principal papel da gelatinase, na patogênese causada por enterococos, como sendo o fornecimento de nutrientes para as bactérias por degradação do tecido hospedeiro, embora também tenha sido descrita sua participação 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, decorrente do enfraquecimento das ligações proteicas entre as células epiteliais que revestem a parede intestinal do hospedeiro e conseqüente rompimento da barreira na mucosa.

### 3.3.5.3 Adesina colágeno

A adesina de colágeno (Ace) 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, 2002b; Koch et al., 2004; Fisher & Phillips, 2009). A adesina de colágeno de *E. faecalis* foi o primeiro de três MSCRAMMs a ser extensivamente caracterizados em enterococos.

O gene *ace* é 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 colagêneo tipo I e tipo IV e a dentina. Sendo assim, a expressão do gene parece contribuir para a patogênese de processos infecciosos ao facilitar a ligação com a célula-alvo (Shepard & Gilmore, 2002b; Dunny et al., 2014; Hancock et al., 2014).

### 3.3.5.4 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 (Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004; Fisher & Phillips, 2009; Ševc & Franz, 2014). Estudos salientam também que a substância de agregação pode facilitar a translocação de *E. faecalis* através do epitélio



intestinal, mediar a aderência às células epiteliais renais e a componentes da matriz extracelular, bem como aumentar a sobrevivência em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos.

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).

#### **3.3.5.5 Biofilmes**

Biofilmes podem ser definidos como grupos de células microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz de substâncias extracelulares produzidas pela própria comunidade. Um biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana ou por várias. (O'Toole et al., 2000). Micro-organismos envolvidos no biofilme possuem estratégias e mecanismos que podem facilitar e/ou prolongar sua sobrevivência em diversos nichos ambientais (Kostakioti et al., 2013).

A formação de biofilme envolve uma mudança na fisiologia do crescimento de células bacterianas planctônicas, as quais passam a se organizar em comunidades onde a comunicação entre as células é responsável por coordenar a expressão de genes e a atividade metabólica do biofilme (Dunny et al., 2014). O “quorum sensing” é o mecanismo que regula processos como virulência, simbiose e transferência horizontal de genes, trazendo benefícios adaptativos para populações bacterianas capazes de formar biofilme

(Chen et al., 2007).

A relevância de biofilmes formados por enterococos deve-se, principalmente, ao fato de a produção de biofilme em dispositivos médicos, tais como cateteres, próteses ósseas ou válvulas cardíacas, por exemplo, promoverem e sustentarem infecções enterocócicas, aumentarem a resistência aos antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro (Sandoe et al., 2003; Mohamed & Huang, 2007; Chuang-Smith et al., 2010; Tsikrikonis et al., 2012).

Isolados clínicos de *E. faecalis* são comumente relacionados com a formação de biofilme. Adesinas de superfície, tais como as proteínas associadas à parede celular (Agg, Esp, Ace), autolisinas e glicolipídeos desempenham um papel importante na formação e na maturação dos biofilmes relatados em isolados dessa espécie. Entretanto, fatores como a composição do meio, as condições físico-químicas e o tipo de superfície utilizada para a formação de biofilmes podem ter uma grande influência sobre sua formação (Mohamed & Murray, 2005; Tsikrikonis et al., 2012; Dunny et al., 2014). Estudos que avaliam a capacidade de formação de biofilme por enterococos isolados de animais marinhos ainda são escassos.

### **3.3.6 Análise da diversidade genética pela técnica de PFGE**

A técnica da eletroforese em campo pulsado “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” - PFGE é um método de tipagem molecular que visa discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, comparando características genotípicas. Esta técnica é utilizada tanto para estudos

epidemiológicos de surtos hospitalares quanto na comparação da estrutura genética de populações bacterianas (Schwartz & Cantor, 1984; Tenover et al., 1995; Magalhães et al., 2005; Teixeira & Merquior, 2013). É, também, uma metodologia reconhecida como padrão ouro para identificação de muitas linhagens fúngicas, de protozoários e de bactérias, como os enterococos (Saeedi et al., 2002; Teixeira et al., 2011; Furukawa & Suzuki, 2013).

O desenvolvimento de metodologias de tipagem genética tem contribuído para o rastreamento e a compreensão da disseminação de micro-organismos em diversos nichos, uma vez que esses sistemas têm como base as observações de que isolados de uma mesma espécie podem apresentar diferenças no DNA decorrentes de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (Tenover et al., 1995).

Diversos estudos têm demonstrado que a PFGE é uma técnica molecular com alto poder discriminatório e reprodutibilidade. Além disso, uma grande vantagem dessa técnica baseia-se no fato de ela analisar o genoma como um todo, diferente de outros métodos de tipagem molecular (Tenover et al., 1995; Saeedi et al., 2002; Teixeira et al., 2011; Furukawa & Suzuki, 2013). A PFGE tem sido aplicada para o rastreamento de contaminação fecal por linhagens de *Enterococcus* spp. em águas recreativas no Japão (Furukawa & Suzuki, 2013). Adicionalmente, pode ser utilizada para investigar a disseminação dos enterococos em diferentes ambientes e hospedeiros, bem como para a compreensão da estrutura populacional, a evolução de linhagens multirresistentes e virulentas, e a emergência e dispersão global de certos

complexos clonais responsáveis por surtos causados por enterococos (Camargo et al., 2008; d'Azevedo et al., 2008; Teixeira & Merquior, 2013).

Porém, algumas limitações na utilização dessa metodologia consistem na necessidade de equipamentos especializados e seu preço elevado, o tempo prolongado para a obtenção dos resultados e a ocorrência de eventos genéticos que poderiam gerar mudanças nos perfis de PFGE. Dessa forma, essa técnica não é recomendada para análises epidemiológicas de períodos prolongados (Tenover et al., 1995; Saeedi et al., 2002; Teixeira & Merquior, 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

Foram coletados suabes cloacais de oito tartarugas marinhas, duas tartarugas-de-pente (*E. imbricata*) e seis tartarugas-verde (*C. mydas*). Existem parâmetros, estabelecidos por Geraci & Lounsbury (2005), que devem ser respeitados para as coletas de amostras para análises microbiológicas e moleculares. Segundo Geraci & Lounsbury (2005) existem cinco estágios que devem ser considerados durante a coleta: o primeiro estágio (*Code 1*) refere-se ao animal ainda vivo; no segundo estágio (*Code 2*), o animal está morto, mas se apresenta ainda fresco, com a carcaça intacta e com boa aparência corporal; no estágio *Code 3*, o animal encontra-se com a carcaça aparentemente intacta, contudo já apresenta sinais de decomposição, como odor característico, membranas mucosas secas, olhos afundados ou ausentes, entre outras características. No *Code 4*, o animal encontra-se em um estágio de decomposição avançado; a carcaça pode estar intacta, entretanto, apresenta danos severos e um odor muito forte; já, no *Code 5*, praticamente só resta o esqueleto, o que restringe muito os estudos sobre o histórico de vida do animal. A maioria das amostras de tartarugas marinhas coletadas eram de animais vivos (*Code 1*), com exceção de uma amostra, que foi obtida de um

animal morto sob grau de decomposição *Code 2*.

A coleta foi feita conforme a autorização prévia do SISBIO (n° 20185), do período de outubro de 2012 a abril de 2014. Os animais foram encontrados vivos ou mortos durante os monitoramentos realizados pela equipe do CECLIMAR no Litoral Norte do Rio Grande do Sul.

O CECLIMAR está localizado no município de Imbé sua equipe desenvolve programas de extensão que divulgam à comunidade informações técnico-científicas provenientes das pesquisas desenvolvidas na Universidade, principalmente projetos ligados à educação ambiental. O Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM) é um desses programas que monitora periodicamente as áreas que compreendem a extensão de Imbé a Torres e de Tramandaí a Quintão, com o intuito de registrar e/ou recuperar os animais debilitados ou mortos na costa do Litoral Norte do Rio Grande do Sul (CECLIMAR, 2016).

#### **4.2 Coleta das amostras**

As coletas obedeceram a um protocolo (Apêndice A) que estabelece alguns critérios e cuidados que foram adotados antes, durante e após cada coleta com o objetivo de preservar a integridade do material biológico. Além disso, cada coleta foi realizada antes do tratamento dos animais com qualquer tipo de ração ou medicamento, uma vez que isso poderia influenciar nos resultados. Uma pequena quantidade de resíduo fecal desses animais foi coletada com a ajuda de um suabe estéril e armazenada em meios de cultivo para transporte. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e

encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFRGS para análises microbiológicas posteriores.

### **4.3 Processamento das amostras: seleção e isolamento de enterococos**

Amostras fecais das tartarugas marinhas foram processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBS/UFRGS. A metodologia empregada para a seleção e o isolamento de bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foi baseada em meios preconizados por Teixeira et al. (2011).

Os suabes fecais foram mergulhados em tubos contendo 10 mL de Caldo Azida Dextrose (*Azida Dextrose Broth*, Himedia<sup>®</sup>, Índia), os quais foram incubados em estufa por 24 horas, a 37°C, sob agitação (100 rpm). A partir desses tubos, foram realizadas diluições seriadas em solução salina 0,85% ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), e 100 µL de cada uma destas seis diluições foram plaqueadas, em triplicata, em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI - *Brain Heart Infusion*, Himedia<sup>®</sup>) acrescido de 6,5% de Cloreto de Sódio (NaCl - Nuclear<sup>®</sup>), sendo incubadas a 37°C, por 24 horas.

Após o período de incubação, trinta unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas, aleatoriamente, conforme metodologia recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 1998). Optou-se por pegar 30 unidades para ver a distribuição, visto que os enterococos são encontrados em concentrações elevadas nas fezes, geralmente entre  $10^5$  e  $10^7$  UFC/g. Posteriormente, essas culturas foram submetidas aos testes

preliminares de caracterização morfofisiológica para a identificação quanto ao gênero dessas bactérias, tais como verificação da capacidade desses isolados de hidrolisar a esculina em presença de sais biliares, produção da catalase, crescimento a 45°C e observação das características morfotintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram.

#### **4.4 Hidrólise da esculina na presença de sais biliares**

Trinta colônias foram isoladas, aleatoriamente, de cada amostra, inoculadas em meio ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, Himedia®) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Os isolados que apresentaram capacidade de hidrolisar esculina na presença de sais biliares, formando colônias visualmente enegrecidas, foram selecionados e preservados em ágar BHI para estudos posteriores.

#### **4.5 Produção da enzima catalase**

A atividade da enzima catalase foi verificada a partir de uma suspensão espessa do micro-organismo depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Lifar®) a 3% (v/v). A ausência de bolhas, que seriam resultantes da hidrólise da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação da enzima catalase produzida pelo microrganismo, foi indicativo de reação negativa.



#### **4.6 Análise microscópica das células bacterianas**

A identificação presuntiva dos isolados bacterianos foi verificada pelo método de Gram. Essa técnica foi realizada com o objetivo de verificar se as bactérias isoladas eram cocos Gram-positivos, isolados, aos pares ou arrançados em cadeias curtas – característico do gênero *Enterococcus*.

Os isolados foram inoculados em ágar BHI (Himedia®), incubados a 37°C, por 24 horas e foram preparadas suspensões bacterianas, a partir dessas colônias, em solução salina 0,85%, com as quais foram preparados esfregaços em lâminas de vidro. Após coloração pelo método de Gram, foram observadas as características morfotintoriais das células ao microscópio óptico com auxílio de objetiva de 100X (imersão).

#### **4.7 Preservação dos isolados bacterianos**

Após a caracterização presuntiva quanto ao gênero *Enterococcus*, as bactérias foram inoculadas em ágar BHI (Himedia®) e incubadas a 37°C durante 24 horas. A partir desse crescimento bacteriano, foram preparadas suspensões bacterianas em solução contendo 10% de *Skim Milk* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e glicerol (Vetec®) a 10% (v/v), e cada isolado foi armazenado em criotubos a – 20°C para análises moleculares posteriores.

#### **4.8 Extração do DNA bacteriano**

O DNA total de todos os isolados bacterianos foi obtido conforme

Pinto *et al.* (2013). As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar BHI (Himedia®), durante 24 horas a 37°C, e removidas da superfície do ágar com auxílio de alça bacteriológica (1 µL) estéril, transportadas para microtubos com 200 µL da solução contendo 5% da resina *Chelex 100* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e 2 µL de proteinase K na concentração de 20 mg/ml (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, CA). Após homogeneização, os tubos foram incubados a 56°C por 1 hora, seguido de incubação a 95°C durante 10 minutos. As soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para todas as reações de PCR subsequentes.

#### 4.9 Confirmação do gênero por PCR

Os estudos moleculares de confirmação do gênero foram realizados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificar a presença do gene *tuf*, de acordo com protocolos adaptados de Ke et al. (1999). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *tuf* estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (*tuf*).

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
Ent_1	TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G	112	Ke et al. (1999)
Ent_2	AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC		

A reação da PCR para o gene *tuf* foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®),

1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (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 ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).

A reação foi incubada em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos. 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 pares de base (pb) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

#### **4.10 Identificação das espécies de *Enterococcus* por PCR**

A identificação molecular dos enterococos foi realizada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para identificar as espécies de enterococos mais frequentemente relatadas na literatura em amostras ambientais: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. mundtii*.

As reações da PCR foram otimizadas para um volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4

$\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen<sup>®</sup>), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 100 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore<sup>®</sup>). Os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos gerados, temperaturas de anelamentos e referências consultadas estão listados na Tabela 3.

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR espécie-específicos (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. gallinarum* e *E. mundtii*), temperatura de anelamento (TA) e tamanhos dos fragmentos gerados.

Oligonucleotídeos iniciadores <sup>1</sup>	Sequência (5' - 3')	TA (°C)	Produto (pb)	Referência
<b>EM1_A</b>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	56	658	Cheng et al. (1997)
<b>EM1_B</b>	TATGACAGCGACTCCGATTCC			
<b>DD13</b>	CACCTGAAGAAACAGGC	54	475	Depardieu et al.(2004)
<b>DD3-2</b>	ATGGCTACTTCAATTTACG			
<b>CA1</b>	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC	50	288	Jackson et al. (2004)
<b>CA2</b>	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG			
<b>HiR1</b>	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA	58	180	Knijff et al. (2001) Prichula (2015)
<b>HiR2</b>	TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC			
<b>GA1</b>	TTACTTGCTGATTTTGATTCCG	50	173	Jackson et al. (2004)
<b>GA2</b>	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
<b>MU1</b>	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	64	98	Jackson et al. (2004)
<b>MU2</b>	GCCATGATTTTCCAGAAGAAT			

<sup>1</sup>*Enterococcus faecium* (EM1\_A e EM1\_B), *Enterococcus faecalis* (DD13 e DD3-2), *Enterococcus casseliflavus* (CA1 e CA2), *Enterococcus hirae* (HiR1 e HiR2), *Enterococcus gallinarum* (GA1 e GA2) e *Enterococcus mundtii* (MU1 e MU2).

Os produtos foram amplificados em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento (a temperatura variou para cada espécie, conforme Tabela 3) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 10 minutos. Cepas-padrão e isolados identificados em trabalhos anteriores por sequenciamento da

região 16S rRNA (foram utilizadas como controles para as seguintes reações: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* 1887, *E. gallinarum* RS-64, *E. hirae* C10 e *E. mundtii* J5 (Santestevan et al, 2015). Os amplicons esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

#### **4.11 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados foi avaliado por meio do teste de disco-difusão em ágar, seguindo-se as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (CLSI, 2014). Os ensaios foram realizados com cultivos dos isolados em ágar BHI (Himedia®) obtidos após incubação a 37°C, por 24 horas, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL).

As suspensões foram semeadas, com o auxílio de suabes esterilizados sobre a superfície das placas contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia®) para obter-se um crescimento uniforme e confluyente. Em seguida, sobre a superfície dos meios inoculados, foram colocados os discos, com o auxílio de uma pinça bacteriológica previamente esterilizada, contendo os seguintes antimicrobianos: ampicilina – AMP (10µg), ciprofloxacina – CIP (5µg), cloranfenicol – CLO (30µg), eritromicina – ERI (15µg), nitrofurantoína – NIT

(300µg), norfloxacin – NOR (10µg), tetraciclina – TET (30µg), vancomicina – VAN (30µg) – rifampicina RIF (5 µg) (Sensifar®, Cefar Diagnóstica Ltda). Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A), foram utilizados discos de estreptomicina – EST (300 µg) e gentamicina – GEN (120 µg) (Sensifar®, Cefar Diagnóstica Ltda).

Após incubação por 24 horas, a 37°C foram realizadas leituras e interpretações dos diâmetros dos halos de inibição, segundo as recomendações do CLSI (2014). Para controle de qualidade dos testes de suscetibilidade, foram utilizadas as seguintes amostras-padrão: *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212.

#### **4.12 Detecção dos genes *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *erm(B)* e *msrC* relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina**

A investigação da presença de determinantes genéticos que codificam resistência à tetraciclina [genes *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(S)*] e à eritromicina [genes *erm(B)* e *msrC*] foi realizada somente nos isolados que apresentaram não-suscetibilidade a esses antimicrobianos. A detecção dos genes foi realizada através da técnica de PCR, de acordo Frazzon et al. (2010). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas abaixo.

TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(S)*, *erm(B)* e *msrC*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
<b>tet(M)_F</b>	GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG	657	Aarestrup et al. (2000)
<b>tet(M)_R</b>	CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA		
<b>tet(L)_F</b>	ACT CGT AAT GGT GTA GTT GC	625	Frazzon et al. (2010)
<b>tet(L)_R</b>	TGT AAC TCC GAT GTT TAA CAC G		
<b>tet(S)_F</b>	TGG AAC GCC AGA GAG GTA TT	720	Aarestrup et al. (2000)
<b>tet(S)_R</b>	ACA TAG ACA AGC CGT TGA CC		
<b>erm(B) 1</b>	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	639	Sutcliffe et al. (1996)
<b>erm(B) 2</b>	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC		
<b>MSRC3</b>	AAG GAA TCC TTC TCT CTC CG	343	Werner et al. (2001)
<b>MSRC4</b>	GTA AAC AAA ATC GTT CCC G		

As reações foram otimizadas para um volume total de 25 µL contendo 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*tet(M)* – Bioneer®; *tet(L)* – IDT®; *tet(S)* – Invitrogen®; *erm(B)* – Bioneer® e *msrC* - Invitrogen®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições:

- a) Para o gene *tet(M)*: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C (Aarestrup et al., 2000).
- b) Para o gene *tet(L)*: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C (Frazzon et al., 2010).

- c) Para o gene *tet(S)*: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C (Aarestrup et al., 2000).
- d) Para o gene *erm(B)*: 3 minutos a 93°C; 35 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C; e 5 minutos a 72°C (Sutcliffe et al., 1996).
- e) Para o gene *msrC*: 3 minutos a 93°C; 35 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C; e 5 minutos a 72°C (Werner et al., 2001).

Como controle positivo para a presença dos genes *erm(B)*, *tet(L)* e *tet(M)* testados foi utilizado o isolado *E. faecalis* 612, já como controle positivo para a presença dos genes *tet(S)* e o *msrC* foi utilizado o isolado *E. faecalis* C133, ambos, oriundos de estudo anterior (Medeiros, 2011). Os amplicons esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

#### **4.13 Detecção de genes de virulência *gelE*, *cyIA*, *ace* e *asa***

A presença dos genes de virulência, *cyIA* (citolisina), *gelE* (gelatinase), *ace* (adesina de colágeno) e *asa* (substância de agregação) foram avaliados em todos os isolados bacterianos, conforme Medeiros (2011). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 5.



TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para *cyIA* (citolisina), *geIE* (gelatinase), *ace* (adesina de colágeno) e *asa* (substância de agregação).

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Produto (pb)	Referência
<i>cyIA</i> _TE17	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT	517	Eaton & Gasson (2001)
<i>cyIA</i> _TE18	TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA		
<i>geIE</i> _TE9	ACC CCG TAT CAT TGG TTT	419	Eaton & Gasson (2001)
<i>geIE</i> _TE10	ACG CAT TGC TTT TCC ATC		
<i>ACE1</i>	AAA GTA GAA TTA GAT CAC AC	320	Mannu et al. (2003)
<i>ACE2</i>	TCT ATC ACA TTC GGT TGC G		
<i>asa</i> _F	GAT ACA AAG CCA ATG TCG TTC CT	101	Shepard & Gilmore (2002b)
<i>asa</i> _R	TAA AGA GTC GCC ACG TTT CAC A		

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*geIE* – Invitrogen®; *cyIA*, *ace* e *asa* – IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).

Os produtos foram amplificados em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Controles positivos, oriundos de trabalhos anteriores, para a presença dos quatro genes foram utilizados: *E. faecalis* 623 e 1233 (Medeiros, 2011). Os produtos de PCR foram analisados em gel de eletroforese com 1,5% de agarose, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e

visualizados sob luz ultravioleta.

#### **4.14 Detecção da atividade da enzima gelatinase**

A atividade da enzima gelatinase (*gelE*) foi avaliada em todos os enterococos conforme protocolos adaptados de Marra et al. (2007) e Medeiros (2011). Colônias cultivadas em placas de meio ágar BHI (Himedia®), a 37°C por 24 horas, foram inoculadas com o auxílio de agulha bacteriológica em tubos contendo 4 mL de BHI caldo (Himedia®) com gelatina 4% (Labsynth), a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, os tubos foram refrigerados a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras que apresentaram o meio liquefeito foram consideradas positivas e as demais foram incubadas, novamente, durante 5 dias, a 37°C seguidas de 30 minutos de refrigeração a 4°C. Por fim, as amostras em que o meio permaneceu sólido foram consideradas negativas para a enzima gelatinase.

#### **4.15 Detecção da atividade da enzima citolisina**

A avaliação fenotípica da enzima citolisina foi realizada somente nos isolados que apresentaram resultado positivo para o gene da citolisina (*cytA*). Os isolados foram previamente crescidos em ágar BHI (Himedia®, India) a 37°C por 24 horas, após o crescimento foram inoculados através de picada em ágar TSA (Acumedia®, Neogen, Michigan) contendo 5% de sangue de cavalo e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período de incubação, conforme protocolo descrito por Mundy et al. (2000) e Semedo et al. (2003)

para a detecção de hemolisina por *Enterococcus* spp., a presença de uma zona clara ao redor da colônia ( $\beta$ -hemólise) foi interpretada como positiva para a produção de hemolisina e a ausência dessas zonas claras ( $\gamma$ -hemólise) bem como o aparecimento de zonas esverdeadas ( $\alpha$ -hemólise) foram consideradas negativas.

#### **4.16 Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

Todas as bactérias foram avaliadas em relação a sua capacidade de formação de biofilme de acordo com protocolo adaptado de Stepanovic et al. (2000). Inicialmente, os isolados bacterianos foram inoculados em placas contendo ágar BHI (Himedia®) e incubados por 18 horas a 37°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspendidas em solução salina 0,85% e ajustadas conforme escala de 0,5 de McFarland. Vinte microlitros dessa suspensão bacteriana foram inoculados em cada poço da microplaca de poliestireno estéril com 96 poços (*Nest Biotech*, USA), previamente preenchida com 180  $\mu$ L de caldo Triptona de Soja (TSB – *Tryptone Soya Broth*, Himedia®) acrescido de 1% de glicose (Vetec®). A primeira coluna de cada microplaca foi inoculada com o controle positivo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984), seguido de um controle negativo (contendo somente 200  $\mu$ L de caldo TSB acrescido de 1% de glicose) e, nos demais poços, os isolados avaliados. Para cada isolado foram utilizados 8 poços (1 coluna) da placa de 96 poços. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após esse período de incubação, o caldo TSB contendo crescimento bacteriano foi descartado. Em seguida, foi realizada a lavagem dos poços com

200  $\mu$ L de solução salina 0,85% estéril (sendo essa etapa repetida por três vezes) para a retirada das células planctônicas. Posteriormente, a microplaca foi invertida sobre papel absorvente a fim de secar os poços e, na sequência, as placas foram fixadas com 150  $\mu$ L de metanol P.A. (Vetec<sup>®</sup>) durante 20 minutos. Transcorrido esse tempo, a microplaca foi invertida e mantida em temperatura ambiente para secagem por 16 horas.

Na sequência, a microplaca foi corada com 150  $\mu$ L de Cristal Violeta (Nuclear<sup>®</sup>) a 0,5% durante 15 minutos. O excesso de corante foi retirado invertendo-se a microplaca e, de lavagem em água corrente. A microplaca corada foi, então, ressuspensa com 150  $\mu$ L de etanol 95% (Vetec<sup>®</sup>) e mantida em repouso por 30 minutos. Após esse período, foi realizada a quantificação do biofilme. A densidade óptica dos biofilmes bacterianos foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro com leitor de microplacas (Molecular Devices – Spectra Max<sup>®</sup> M2<sup>e</sup>) utilizando-se comprimento de onda de 492 nm. A classificação foi estabelecida de acordo com a densidade óptica, seguindo-se o padrão demonstrado por Stepanovic et al. (2000).

Os isolados bacterianos foram classificados em quatro categorias, de acordo com sua capacidade de formação de biofilme: não formador, fraco formador, moderado formador e forte formador (Stepanovic et al., 2000). O ponto de corte da densidade óptica ( $OD_c$ ) foi determinado como três desvios-padrões acima da média de OD do controle negativo. Calculou-se a capacidade de formação de biofilme dos isolados conforme descrito abaixo:

$OD \leq OD_c$  Não formador (N.F)

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  Fraco formador (FF)

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Moderado formador (M)
$4 \times OD_c < OD$	Forte formador (F)

#### **4.17 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Para a análise do perfil genotípico das amostras por PFGE foram selecionados 60 isolados de um total de 158, que possivelmente representariam os perfis clonais existentes. A seleção das amostras levou em consideração características fenotípicas de perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e genotípicas como a presença ou ausência de fatores de virulência e resistência. A técnica de PFGE foi realizada de acordo com protocolos adaptados de Pinto et al. (2013).

As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar BHI (Himedia®) por 24 horas a 37°C. Após esse período, uma colônia bacteriana foi retirada da placa com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e inoculada em um microtubo contendo 1 mL de caldo BHI (Himedia®), por 8 horas a 37°C. Na sequência, essa suspensão bacteriana foi centrifugada (3000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, 300 µL de tampão PIV [NaCl 1M, Tris HCl 10mM (Vetec®) pH 7,6] foi adicionado ao precipitado e foi realizada a centrifugação (3000 rpm por 10 minutos), essa etapa foi repetida por três vezes. Depois das 3 lavagens com o tampão PIV, 300 µL de agarose de baixa temperatura de fusão (Invitrogen®) a 1,8% em tampão PIV foram adicionados à suspensão. Após homogeneização, o material foi distribuído em

moldes para a elaboração dos blocos.

Após solidificação, os blocos de agarose, contendo as células bacterianas, foram submetidos ao tratamento com solução de lise [6 mM Tris-HCl (Vetec®) pH 7,6; 1 M NaCl (Vetec®), 100 mM EDTA (Vetec®) pH 7,5; 0,5% (p/v) de Brij 58 (Sigma-Aldrich®), 0,5% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio (Sigma-Aldrich®), 0,2% de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich®), 1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich®) e 10 U/mL de mutanolisina (Sigma-Aldrich®)] e incubados por 18-24 horas a 37°C, sob agitação. Posteriormente, essa solução foi substituída pela solução ESP [0,5M EDTA (Vetec®), pH 8,0; 1% (p/v) lauril sarcosinato de sódio (Sigma-Aldrich®), 0,1 mg/mL proteinase K (Sigma-Aldrich®)], incubando-se por 1 hora a 50°C. Após esse período de incubação, repetiu-se mais uma troca de solução ESP e o material foi novamente incubado nas mesmas condições citadas anteriormente. A partir dessa etapa, um dos blocos de agarose (*plug*) foi imediatamente preparado para a digestão enzimática.

O *plug* escolhido foi lavado com 2 mL do tampão TE [10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 mM EDTA (Vetec®)] por seis vezes (uma vez a cada 20 minutos) e os *plugs* restantes foram mantidos a 4°C para repetições, caso necessário. Depois disso, o *plug* foi tratado com o tampão específico da enzima de restrição durante 30 minutos a 25°C, para equilibrar a solução, e, após esse período, foi incubado com 20 U da endonuclease de restrição *Sma*I (Quatro G. Ltda.), preparada em seu próprio tampão de acordo com as instruções do fabricante e incubada durante 2 horas a 25°C. O bloco de agarose contendo o DNA cromossômico foi fundido a 72°C e aplicado nos poços do gel de corrida,

preparado com 1,2% (p/v) de agarose (Agargen) em tampão TBE 0,5 X (Sigma-Aldrich®) (pH 8,4). Padrões de massa moleculares conhecidos de “Lambda Ladder PFG Marker” (New England Biolabs) foram utilizados para avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA no primeiro e no último poços do gel.

Os fragmentos de restrição foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado utilizando-se o CHEF DR II (Bio-Rad), programado para dois blocos diferentes de corrida com os seguintes parâmetros conforme Saeedi et al. (2002):

**Bloco 1:** pulso inicial de 5 segundos e final de 35 segundos, gradiente de voltagem 6 V/cm, temperatura de 14°C e tempo de corrida de 20 horas.

**Bloco 2:** pulso inicial de 5 segundos e final de 10 segundos, gradiente de voltagem 6 V/cm, temperatura de 14°C e tempo de corrida de 4 horas.

O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (Ludwig Biotecnologia) 0,5 µg/mL e observado em um transiluminador (Molecular Imager®, Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Software, Bio-Rad) sob luz UV e fotografado.

A análise dos perfis de fragmentação das amostras foi realizada pela inspeção visual; a análise automatizada foi realizada com auxílio do programa “Bionumerics”, Versão 7.1 (Applied Maths, Belgium). Os percentuais de similaridade dos perfis de fragmentação foram estimados pelo Coeficiente de

*Dice.* Foram gerados dendrogramas utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) com otimização de 0,5% e tolerância de 1%.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de enterococos das amostras de fezes de tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas avaliadas neste estudo foram encontradas nas praias de Tramandaí, Capão da Canoa, Palmares do Sul, Cidreira, Magistério, Litoral Médio Leste e Nova Tramandaí, no período de outubro de 2012 a abril de 2014. As oito amostras foram identificadas como T1 (tartaruga 1), T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8. A classe etária desses animais era predominantemente juvenil, à exceção de uma das tartarugas (T4), que era adulta, conforme dados do CECLIMAR a respeito das amostras (Tabela 6).

Em relação ao estado físico das tartarugas marinhas avaliadas no presente estudo, sete foram encontradas vivas, debilitadas e encalhadas classificadas como *Code 1*, e uma tartaruga foi encontrada morta classificada como *Code 2* (carcaça intacta e com boa aparência corporal, sob grau de decomposição) (Geraci & Lounsbury, 2005).

A partir das oito amostras fecais de tartarugas marinhas, foi possível isolar 158 enterococos: 20 isolados da amostra de fezes da tartaruga 1 (T1), 23 da amostra T2, 19 isolados da T3, 20 isolados da T4, 16 isolados da T5, 17 isolados da T6, 20 isolados da T7 e 20 isolados da T8.

TABELA 6: Informações referentes às amostras utilizadas no estudo.

Animal	Município	Data da coleta	Estado físico	Geraci Code	Motivo da baixa	Classe etária	Amostra	Nº de isolados
3082	Tramandaí	23/12/12	Vivo	1	Debilitado	Juvenil	T1	20
3171	Capão da Canoa	25/02/13	Vivo	1	Debilitado	Juvenil	T2	23
3004	Tramandaí	01/10/12	Vivo	1	Debilitado	Juvenil	T3	19
3041	Palmares do Sul	04/11/12	Vivo	1	Debilitado	Adulto	T4	20
TM 619	Cidreira	29/05/13	Morto	2	-	Juvenil	T5	17
3394	Magistério	22/04/14	Vivo	1	Encalhada	Juvenil	T6	19
3396	Litoral Médio Leste	23/04/14	Vivo	1	Encalhada	Juvenil	T7	20
3399	Nova Tramandaí	25/04/14	Vivo	1	Encalhada	Juvenil	T8	20

Outros estudos isolaram enterococos de amostras de fezes de animais marinhos. Layton et al. (2010) rastrearam enterococos como indicadores da qualidade de águas recreativas na Califórnia (EUA), e isolaram este gênero em amostras de fezes de leões-marinhos e gaivotas. Enterococos também foram isolados de 57,6% (144/ 250) amostras de fezes de equinodermos na Ilha de Açores em Portugal (Marinho et al., 2013). Santestevan et al., (2015) avaliaram a presença de enterococos em amostras de fezes de lobos-marinhos encontrados no Litoral Norte do RS e isolaram enterococos em 80% (8/10) das amostras. Prichula (2015) isolou enterococos de amostras fecais de pinguins-de-magalhães encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dos poucos estudos atuais existentes que relacionam o gênero enterococos e répteis, podemos citar Nowakiewicz (2015) que realizou uma análise comparativa das bactérias aeróbias isoladas das cloacas de *Emys orbicularis* (cágado-de-carapaça-estriada) que viviam em seu ambiente natural

e criados em cativeiros. Dentre as espécies bacterianas mais prevalentes estavam o *Enterococcus faecalis*.

## **5.2 Confirmação do gênero e identificação das espécies por PCR**

Neste estudo, verificou-se que todos os 158 isolados selecionados apresentavam o fragmento de DNA de 112 pb, correspondente ao gene *tuf*, confirmando a identificação do gênero. Todos os isolados foram submetidos a PCR convencional utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos e 88 (55,7%) apresentaram amplificação compatível para a espécie *E. faecalis*, com o fragmento de DNA de 475 pb, 37 (23,4%) amplificaram o fragmento de DNA de 658 pb esperado para a espécie *E. faecium*, 24 (15,2%) isolados amplificaram o fragmento de DNA de 180 pb esperado para a espécie *E. hirae* e 9 (5,7%) isolados amplificaram o fragmento de DNA de 288 pb esperado para a espécie *E. casseliflavus*. No presente estudo não foi encontrada a espécie *E. gallinarum* (Figura 11).

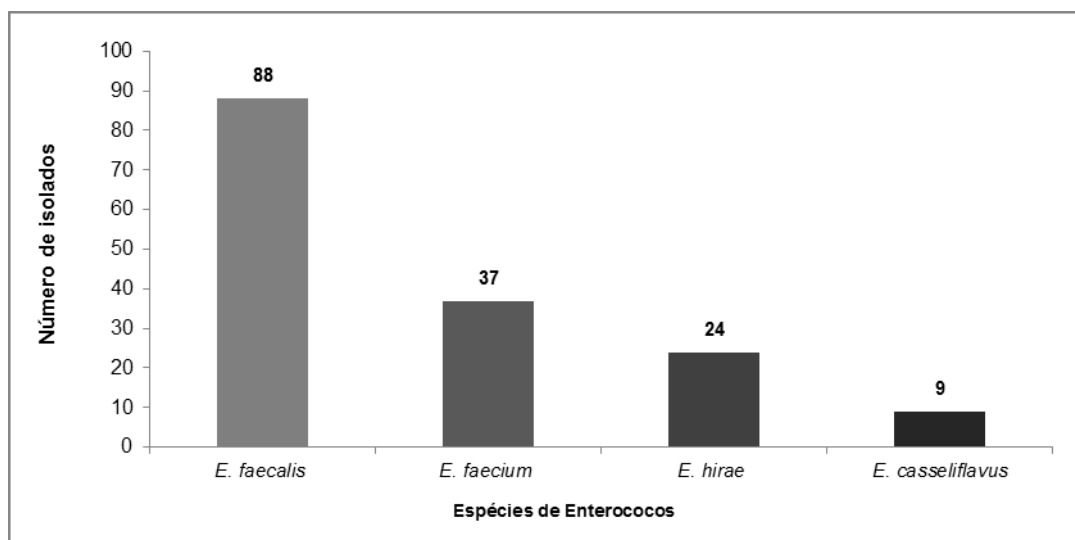


FIGURA 11. Distribuição de espécies de enterococos da microbiota intestinal de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dos 88 isolados identificados como *E. faecalis*, 11 pertenciam à amostra T1; um à amostra T2; 17 à amostra T5; 19 à amostra T6; 20 à amostra T7 e 20 à amostra T8. Já dos 37 *E. faecium* identificados, 19 isolados pertenciam à amostra T3; 18 isolados à amostra T4. Dos 24 isolados identificados como *E. hirae*, 22 pertenciam à amostra T2 e dois isolados pertenciam à amostra T4. Por fim, todos os nove isolados identificados como *E. casseliflavus* pertenciam à amostra T1.

Em relação às espécies de tartarugas, *E. faecalis* e *E. faecium* foram mais frequentes nas amostras de tartaruga-verde, enquanto que *E. hirae* e *E. casseliflavus* foram mais frequentes nas amostras de tartaruga-de-pente, conforme Tabela 7.

TABELA 7: Distribuição de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas.

Espécies (n)	Porcentagem (n) de enterococs isolados de	
	Tartaruga-de-pente	Tartaruga-verde
<i>E. faecalis</i> (88)	13,6 (12/88)	86,4 (76/88)
<i>E. faecium</i> (37)	---	100 (37/37)
<i>E. hirae</i> (24)	91,7 (22/24)	8,3 (2/24)
<i>E. casseliflavus</i> (9)	100 (9/9)	---

n: número de isolados de cada espécie.

Dentre as espécies avaliadas *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* foram as espécies mais prevalentes no trato gastrointestinal das tartarugas marinhas, seguidas de *E. hirae* e *E. casseliflavus*. Apesar de haver poucos estudos que envolvam enterococos isolados a partir de animais marinhos, bem como estudos que envolvam enterococos e répteis, estes resultados estão de acordo com dados da literatura que salientam a prevalência dessas duas espécies no trato gastrointestinal de animais.

*Enterococcus hirae* foi a espécie mais prevalente nas fezes de tartarugas-de-pente. Esta é uma espécie encontrada em muitos hospedeiros animais, mas com menos frequência em humanos. Esta espécie tem sido associada a condições patológicas, particularmente em espécies aviárias, sendo responsável por causar septicemia e necrose no cérebro de frangos recém-nascidos e casos de septicemia em psitacíformes (Devriese et al., 1995). Está associada, principalmente, com condições patológicas em animais (Aarestrup et al., 2002). Contudo, endocardite humana (Talarmin et al., 2011) e septicemia causadas por *E. hirae* também têm sido relatados (Gilad et al., 1998).

O predomínio de algumas espécies pode estar relacionado também

com o fato de os fatores de virulência estarem mais associados com algumas espécies, as quais acabam levando vantagens sobre as outras e predominando nas amostras (Fischer & Phillips, 2009). Além disso, as técnicas cultiváveis, bem como a própria metodologia podem ser fatores limitantes quando se trata de isolamento, visto que pode favorecer o crescimento de algumas cepas e/ou suprimir outras que não são capazes de crescer nas condições de laboratório.

Barros et al. (2011) avaliaram a presença de enterococos em amostras fecais de uma espécie de peixe (*Sparus aurata*) capturada no Oceano Atlântico, na costa de Portugal, e observaram a presença de *E. faecium* (91,8%), seguida de *E. faecalis* (8,2%). Bennani et al. (2012) avaliaram amostras de água do mar, mariscos e sedimentos costa mediterrânea do Marrocos e observaram diferenças na prevalência de espécies de enterococos, onde *E. faecium* (38%) foi a espécie mais frequente, seguida por *E. faecalis* (36,6%), *E. casseliflavus* (15,3%), *E. durans* (11,4%).

Marinho et al. (2013) isolaram *Enterococcus* spp. de amostras de fezes de equinodermos coletados de águas de Açores, Portugal. Um total de 144 enterococos foi recuperado, sendo a maioria *E. faecium* (83,3%), seguida por *E. hirae* (9,7%), *E. faecalis* (5,6%) e *E. gallinarum* (1,4%).

Santestevan et al. (2015) avaliaram amostras fecais de oito lobos marinhos encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul (RS) e obtiveram 160 enterococos. Destes, a espécie mais frequente 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%). Prichula (2015) avaliou amostras fecais de nove pinguins-de-magalhães também recuperados no Litoral Norte do

RS e obteve 172 enterococos. As espécies detectadas foram *E. faecalis* (43%), *E. faecium* (33,7%), *E. hirae* (12,8%) e *E. mundtii* (10,5%).

Nowakiewicz et al. (2015) avaliaram 130 amostras da cloaca de cágados-da-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*) e entre as bactérias isoladas, estavam os enterococos. As espécies identificadas foram *E. faecium* (75,4%), *E. faecalis* (10,8%), *E. casseliflavus* (6,15%), *E. mundtii* (3,8%), *E. gallinarum* (0,8%) e *E. cecorum* (0,8%). Outros estudos com tartarugas de água doce da espécie *Clemys muhlenbergii* isolaram enterococos da cloaca e da cavidade timpânica desses animais (Brenner et al 2002; Joyner et al. 2006).

Layton et al. (2010) salientam que a detecção de enterococos em amostras de ambientes marinhos podem 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 desses ambientes.

A partir da análise dos dados gerados em estudos envolvendo enterococos e o ambiente marinho, entende-se que algumas espécies possam ser componentes naturais do ecossistema marinho, seja da água, de sedimentos, ou mesmo de animais. A discrepância na ocorrência e na prevalência de espécies de enterococos podem estar relacionados com a idade, estado de saúde, a composição da dieta e/ou o caminho migratório percorrido pelo animal ao longo da vida, entre outros fatores (Cassenego et al., 2013; Lebreton et al., 2014).

### 5.3 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Entre os 158 enterococos avaliados, 42,4% (67/158) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Resultados semelhantes a esses foram relatados por Santestevan et al. (2015) que verificaram que 58,13% (93/160) dos enterococos, obtidos de lobos-marinhos do Litoral Norte do RS eram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e Prichula (2015) verificou que 66,3% (114/172) dos enterococos, obtidos de pinguins-de-magalhães no Litoral Norte do RS foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Marinho et al. (2013), que demonstraram que cerca de 20% (26/144) dos enterococos isolados de equinodermos das Ilhas de Açores foram suscetíveis aos antimicrobianos testados.

Conforme verificado na Tabela 8, todos os isolados foram suscetíveis a pelo menos oito (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, nitrofurantoína, vancomicina, ciprofloxacina e norfloxacina) dos 11 antimicrobianos testados.



TABELA 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies de *Enterococcus* spp. isoladas de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Agentes Antimicrobiano	ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS											
	<i>E.faecalis</i> (n=88)			<i>E.faecium</i> (n=37)			<i>E.hirae</i> (n=24)			<i>E.casseliflavus</i> (n=9)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<b>AMP</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>CLO</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>EST</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>GEN</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>NIT</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>VAN</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>CIP</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>NOR</b>	88	-	-	37	-	-	24	-	-	9	-	-
<b>TET</b>	88	-	-	36	-	1	24	-	-	9	-	-
<b>ERI</b>	74	14	-	-	21	16	24	-	-	6	3	-
<b>RIF</b>	55	25	8	22	5	10	22	2	-	7	2	-

AMP, ampicilina; CLO, cloranfenicol; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; VAN, vancomicina; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; RIF, rifampicina.

Fenótipos de resistência foram encontrados para rifampicina (32,9%; 52/158), eritromicina (34,2%; 54/158) e tetraciclina (0,63%; 1/158). Estudos com outros animais marinhos também encontraram enterococos resistentes a tetraciclina e à eritromicina. Marinho et al. (2013) encontraram percentagens de resistência para eritromicina (31,3%), ampicilina (29,9%), tetraciclina (29,2%) e ciprofloxacina (25,7%) nos enterococos isolados de equinodermos das Ilhas de Açores. Santestevan et al. (2015) verificaram que propriedades de resistência foram mais frequentemente encontradas para eritromicina (21,25%), nitrofurantoína (15,62%), tetraciclina (6,25%), norfloxacina (3,12%) e ciprofloxacina (3,12%) em enterococos isolados das amostras fecais de lobos-

marinhos. Prichula, (2015) encontrou fenótipos de resistência para ciprofloxacina (28,5%), eritromicina (25%), norfloxacina (14,5%) e tetraciclina (4,6%) em enterococos isolados das amostras fecais de pinguins-de-magalhães.

Percentuais significativos de enterococos resistentes à eritromicina e à tetraciclina também foram observados em isolados de amostras fecais de peixe (*Sparus aurata*) capturado na costa de Portugal por Barros et al. (2011) onde observaram 58,9% de enterococos resistentes a eritromicina e 17,8% resistentes a tetraciclina. Além desse, outros estudos que avaliavam a qualidade da água de praias recreativas também demonstraram elevados percentuais de resistências a diversos antimicrobianos utilizados comumente na clínica médica e veterinária, confirmando a ocorrência de resistência em ecossistemas marinhos (Bennani et al., 2012; Dada et al., 2013; Ahmad et al., 2014).

A análise dos perfis de resistência, de acordo com as espécies de enterococos, demonstrou que, assim como no trabalho de Santestevan et al. (2015), foi observado percentuais menos elevados de resistência para as espécies *E. faecalis* e *E. hirae*. O presente estudo constatou que 8,3% (2/24) dos *E. hirae* apresentaram resistência intermediária à rifampicina. Em relação aos *E. faecalis*, 15,9% (14/88) apresentaram resistência intermediária à eritromicina, 9,1% (8/88) resistência intermediária a rifampicina e 28,4% (25/88) resistência a rifampicina. Baixos percentuais de resistência para *E. faecalis* também foram observadas no trabalho de Prichula (2015).

Em contrapartida, elevados percentuais de resistência foram

detectados entre os isolados de *E. faecium*. Cerca de 43,2% (16/37) dos isolados apresentaram fenótipos de resistência à eritromicina; 27% (10/37), à rifampicina e 2,7% (1/37) à tetraciclina. Além disso, 43,2% (16/37) dos *E. faecium* apresentaram propriedades de resistência a duas classes de antimicrobianos diferentes, sendo considerados multirresistentes. Bactérias com esse perfil têm sido relatadas também em outros estudos com animais marinhos (Barros et al., 2011; Santestevan et al., 2015; Prichula, 2015), demonstrando que este fenótipo de resistência combinada, comumente encontrado em enterococos clínicos e de alimentos, tem sido encontrado em isolados ambientais (Wright, 2007).

Arvanitidou et al. (2001) encontraram, entre os 316 enterococos avaliados, 87,3% de 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. Ainda nesta investigação, assim como para as tartarugas marinhas, a resistência à eritromicina foi a observada em elevada frequência (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. Poeta et al. (2005) encontraram 20,1% de bactérias resistentes a eritromicina entre seus 140 isolados de enterococos de animais selvagens.

Os dados descritos por Barros et al. (2011) corroboram com os achados neste estudo, uma vez que, também obtiveram percentuais

expressivos de resistência a eritromicina (59,7%) e tetraciclina (14,9%) envolvendo *E. faecium* obtidos de peixe (*S. aurata*) capturados na costa de Portugal. Além disso, 25,4% dos isolados de *E. faecium* mostraram-se também resistentes a dois ou mais antimicrobianos. De acordo, ainda, com os autores, a poluição da água com antimicrobianos pode ser um fator que contribuiu para a detecção dessa resistência.

Marinho et al. (2013) relataram, também, elevados percentuais de resistência em *E. faecium* obtidos de equinodermos coletados de águas de Açores, Portugal. Cepas resistentes à eritromicina e à tetraciclina foram observadas com um percentual de 33% (40/120) e 31,7% (38/120), respectivamente. O estudo ressalta que os dados encontrados auxiliam no conhecimento sobre a disseminação de cepas resistentes por meio dos ecossistemas marinhos e as possíveis consequências envolvidas na transferência dessas resistências para outros animais ou para humanos (Marinho et al.,2013).

Embora existam poucos estudos que descrevam a resistência de enterococos a rifampicina em animais. Enne et al. 2004 relatou *E. faecium* resistentes a rifampicina em amostras fecais de porcos. Valenzuela, 2009 isolou *Enterococcus* spp. resistentes a rifampicina em alimentos de origem animal como leite, queijo, carne e presunto; Schwaiger et al. (2011) avaliou *E. faecalis* resistentes isolados de vegetais, cereais e frutos. Martins-Leite et al., 2015 determinaram a prevalência da resistência antimicrobiana em enterococos isolados de fezes de animais de estimação, foram coletadas amostras de 74 cães e 17 gatos. Um total de 315 enterococos foram isolados,

onde 61% foram considerados multirresistente. Perfis de resistência foram encontrados para tetraciclina, 67%; rifampicina, 60%; e eritromicina, 53%.

Tejedor-Junco et al., 2015 avaliaram fezes de camelos nas Ilhas Canárias e encontraram cerca de 42% de enterococos resistentes a rifampicina. Bessa et al., 2014 avaliaram a qualidade microbiológica e a resistência a antimicrobianos de bactérias fecais de um rio em Portugal. Os *Enterococcus* spp. isolados foram, principalmente, resistente à rifampicina, tetraciclina, azitromicina e eritromicina. Os níveis elevados de enterococos e a notável variedade de perfis de resistência antimicrobiana, reforçam a teoria que estas águas do rio podem ser um grupo de determinantes de resistência a antimicrobianos, que podem facilmente espalhar-se entre as bactérias diferentes e chegar a outros ambientes.

Pasquaroli, 2014, em seu estudo, destacaram a possibilidade de seleção de resistência aos antimicrobianos no ambiente marinho através de metais pesados. A liberação contínua de metais pesados em ambientes aquáticos pela indústria, pela agricultura e pela agropecuária (Gao et al., 2011; Seiler & Berendonk, 2012) podem agir como uma co-seleção para a resistência aos antimicrobianos. Além disso, os metais pesados não sofrem degradação e podem, portanto, constituir uma pressão seletiva a longo prazo (Baker-Austin et al., 2006). Dados encontrados por Pasquaroli corroboram com os resultados encontrados por outros autores, sobre o envolvimento de sedimentos marinhos na disseminação da resistência aos antimicrobianos (Di Cesare et al, 2012; Di Cesare et al, 2013; Vignaroli et al., 2012).

Enterococos resistentes a antimicrobianos em reservatórios não humanos são cada vez mais frequentes na medida em que são realizados estudos nessa direção. Contudo, a contribuição desses agentes biológicos para a disseminação da resistência ainda é muito discutida (Santestevan et al., 2015; Prichula, 2015). O fluxo de bactérias resistentes e de genes de resistência de animais selvagens permanece ainda pouco compreendido (Klibi et al., 2014).

Micro-organismos em nichos específicos podem co-evoluir, copiando estratégias para competir por recursos, por exemplo, pela transferência horizontal de genes de resistência a partir de outras espécies bacterianas (Wright, 2007). Assim, bactérias consideradas não patogênicas podem ser selecionadas e servir de reservatório para genes de resistência (Baquero et al., 2008). Dessa forma, a capacidade dos *Enterococcus* em transmitir e adquirir genes de resistência de outras bactérias por mecanismos de transferência horizontal pode contribuir diretamente para a disseminação da resistência nos ambientes marinhos (Di Cesare et al., 2013).

Segundo Wright (2007) genes relacionados à resistência antimicrobiana podem ser constituintes genéticos naturais de muitas bactérias não patogênicas. Entre os elementos incluídos no resistoma estão todos os genes de resistência crípticos, que não são necessariamente expressos, e também genes precursores que codificam as proteínas com atividade de resistência moderada, os quais podem evoluir para genes de resistência efetiva, (Wright, 2007). Portanto, características de resistência evidenciadas em ambientes marinhos podem ter surgido tanto a partir do contato com poluentes

oriundos de ações antrópicas, quanto podem ser atribuídas ao resistoma antimicrobiano, o que destaca a importância de pesquisas para o entendimento da evolução dos mecanismos de resistência.

#### **5.4 Presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *erm(B)* e *msrC* relacionados a resistência bacteriana a tetraciclina e a eritromicina**

A avaliação de genes de resistência, bem como sua localização e diversidade são importantes para compreensão dos fatores envolvidos na resistência (Guimarães et al., 2010). Além disso, a determinação do perfil genético dos genes associados à resistência; e a alta frequência e diversidade de perfis antimicrobianos entre os isolados de enterococos podem ser usados como ferramentas para o estudo de epidemiologia e de tipagem molecular (Teixeira & Merquior, 2013).

A presença dos genes *tet(M)*, *tet(L)* e *tet(S)* foi avaliada no único isolado que apresentou resistência à tetraciclina, o isolado de *E. faecium* da amostra T4. Contudo, não foi possível detectar nenhum dos três genes no isolado testado. A resistência à tetraciclina costuma ser mediada por dois mecanismos, 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 (Garrido et al., 2014). 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). A ausência da detecção dos genes que costumam ser relatados como as principais estratégias de resistência em isolados clínicos, sugere a existência de outros genes de resistência, como por exemplo, genes *tet(O)* e *tet(K)* que não foram testados.

O gene *erm(B)* e *msrC* foram avaliados em todos os isolados que apresentaram resistência à eritromicina (n=54). O gene *erm(B)* não foi detectado em nenhum dos isolados testados. Já o gene *msrC* foi positivo para 68,5% (37/54) dos isolados testados, todos *E. faecium*. Existem diferentes determinantes de resistência à eritromicina, mas o principal mecanismo envolvendo isolados de enterococos resistentes a macrolídeos é a modificação no sítio alvo de ação do antimicrobiano, devido a uma rRNA metilase codificada por genes *erm*. Sendo o mais comum, o *ermB*, que 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/ou *ermC* e *mef(A)* que podem estar envolvidos com a resistência à eritromicina (Murray, 1990; Diarra et al., 2010; Kristich et al., 2014).

Embora *msrC* possua 62% de identidade com o gene *msrA* dos estafilococos, o seu papel fisiológico permanece controverso (Liu et al. 2009). Portillo et al. (2000) não encontraram uma correlação entre a presença do gene *msrC* com diferentes fenótipos de resistência em *E. faecium*, ou seja, em todos os 23 isolados testados foram encontrados o gene *msrC* para fenótipos diferentes de resistência a eritromicina. Singh et al. 2001 relataram a presença



do gene *msrC* nos 233 *E. faecium* testados. A presença do gene *msrC* em todos os isolados de *E. faecium* também foi relatada em outros estudos (Del Grosso et al., 2002; Loch, 2005). Esses trabalhos sugeriram que a presença do gene *msrC* em todos os isolados de *E. faecium* seria uma característica intrínseca dessa espécie. No entanto, Liu et al. (2009) sugeriram que *msrC* não está igualmente distribuído em todos os isolados de *E. faecium*, além disso, demonstraram que a inativação do gene levava a uma diminuição do MIC para macrolídeos em até 8 vezes, demonstrando sua relação com a resistência. Ademais, a expressão *msrC* pode proteger *S. aureus* contra a eritromicina e outros antimicrobianos, indicando que o gene *msrC* não é intrínseco a todos *E. faecium* (Singh et al. 2001).

Uma possível explicação para o fenótipo de resistência à eritromicina verificado nos isolados que não apresentaram o gene *msrC*, neste estudo, pode ser que essa resistência seja mediada por uma bomba de efluxo, codificada pelo gene *mef(A)*. Esse mecanismo também é conhecido por bombear macrolídeos para fora da célula, entretanto confere um nível mais baixo de resistência do que *erm(B)* (Kristich et al., 2014).

A resistência a antimicrobianos e seus mecanismos já foram avaliados em outros trabalhos com animais marinhos. Os genes *erm(B)*, *tet(M)* e/ou *tet(L)* foram reportados em um estudo com enterococos isolados de amostras fecais de peixe (*S. aurata*) da costa de Portugal (Barros et al., 2011). Di Cesare (2012) detectaram e caracterizaram os enterococos resistentes aos antimicrobianos em água salgada e sedimentos marinhos no Mediterrâneo. Foram encontrados fenótipos de resistência para tetraciclina e eritromicina;

entre as espécies *E. faecium* foi a mais prevalente resistente, seguida de *E. faecalis* e *E. casseliflavus*. Também foi analisado, por PCR, os possíveis genes de resistência, onde *tet(M)* foi o gene mais frequente para resistência a tetraciclina e *msrC* foi o único gene de resistência detectado para eritromicina. Esses dados corroboram com o presente estudo.

Marinho et al. (2013) avaliaram enterococos isolados de fezes de equinodermos e elevados percentuais de resistência foram encontradas para eritromicina e tetraciclina, e os genes *erm(A)* ou *erm(B)*, *tet(M)* e/ou *tet(L)* foram encontrados nos isolados resistentes a esses antimicrobianos (Marinho et al., 2013). Além disso, Santestevan et al. (2015) também verificou a presença dos genes *erm(B)* e *tet(M)* em isolados de enterococos resistentes à eritromicina e à tetraciclina, respectivamente, obtidos de lobos marinhos.

## 5.5 Detecção de genes de virulência por PCR

Os fatores de virulência no gênero *Enterococcus* ainda não foram completamente compreendidos. Porém, quando comparados com outros microorganismos Gram-positivos, sabe-se que os enterococos são menos virulentos. Todavia, a capacidade de transferência genética por meio de plasmídeos e transposons e os diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, intrínsecos e adquiridos, podem contribuir para o aumento de sua virulência e aumentar as preocupações em relação a esse gênero (Eaton & Gasson, 2001; Poeta et al., 2005).

Citolisina (*cyl*), gelatinase (*gelE*), substância de agregação (*agg*), adesina de colágeno (*asa*) estão entre os principais fatores de virulência em enterococos (Eaton & Gasson, 2001; Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2004; Medeiros et al., 2013). Esses determinantes de virulência podem auxiliar na promoção da persistência de enterococos no ambiente hospitalar e, conseqüentemente, na disseminação inter e intra-hospitais (Camargo et al., 2008).

Todos enterococos isolados no presente estudo foram avaliados por PCR quanto à presença dos genes, *cylA*, *gelE*, *ace* e *asa*, envolvidos com a virulência em enterococos. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9. Distribuição dos genes de virulência *cylA*, *gelE*, *ace* e *asa* nas diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

<b>Número de amostras positivas para PCR para os genes</b>				
<b>Espécies (n)</b>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>ace</i>	<i>asa</i>
<b><i>E. faecalis</i> (88)</b>	87	36	87	60
<b><i>E. faecium</i> (37)</b>	0	0	0	0
<b><i>E. hirae</i> (24)</b>	0	0	0	0
<b><i>E. casseliflavus</i> (9)</b>	0	0	0	0
<b>TOTAL (158)</b>	<b>87</b>	<b>36</b>	<b>87</b>	<b>60</b>

Foi observada uma grande distribuição de fatores de virulência nos isolados de *E. faecalis*. A maior frequência observada foi para os genes *gelE* e *ace*, com 98,86% (87/88), seguidos de *asa*, com 68,18% (60/88), e *cylA* com 40,90% (36/88). Essa ampla presença de fatores de virulência também foi encontrada em estudos com isolados de enterococos clínicos, de alimentos e

de animais selvagens, *E. faecalis* é a espécie que apresenta o maior e mais bem elucidado arsenal de fatores de virulência quando comparado com as demais espécies desse gênero (Eaton & Gasson, 2001; Poeta et al., 2005). *Enterococcus faecalis* possui múltiplos determinantes de virulência, o que reforça a evidência na patogenicidade (Eaton & Gasson, 2001).

Santestevan et al., (2015) detectaram os genes de virulência em diferentes espécies de enterococos. Entre 160 isolados obtidos de lobos-marinhos, 69,4% (111/160) apresentaram pelo menos um dos genes testados. Dos 81 *E. faecalis* isolados, 93,8% (76/81) apresentaram o gene *ace*; 76,5% (62/81), o gene *gelE*; 11,1% (9/81), o gene *asa*; e 4,9% (4/81), o gene *cyfA*.

Prichula (2015), também avaliou a presença desses genes em pinguins-de-magalhães e os encontrou somente na espécie *E. faecalis*. Sendo *gelE* e *ace* os genes mais prevalentes, com 43% (74/142), seguidos de *asa*, com 35,5% (61/172). Assim como neste trabalho, a espécie *E. faecium* de ambos os estudos não apresentou nenhum dos quatro genes relacionados à virulência.

Embora a presença desses genes de virulência neste estudo tenha sido relatada somente em *E. faecalis*. Esses genes, também, têm sido descritos em outras espécies de enterococos, como *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* (Eaton & Gasson, 2001; Poeta et al., 2005; Santestevan et al, 2015). Os enterococos possuem mecanismos de transferência de genes altamente eficazes e sabendo-se que a maioria dos genes de virulência é conhecida por estar associada com alguns plasmídeos altamente transmissíveis, é importante considerar a possibilidade de micro-

organismos que carecem de genes de virulência terem adquirido esses genes por conjugação (Eaton & Gasson, 2001).

Guerrero-Ramos (2016) avaliaram um total de 55 enterococos (45 *E. faecium*, 7 *E. faecalis*, e 3 *E. durans*) isolados de carne de animais selvagens de caça (veados, javalis, coelho, faisão e pombo) no noroeste da Espanha. Nove fatores de virulência foram estudados, dentre eles o gene *gelE*, que foi encontrado em pelo menos 10 % dos isolados.

Esses genes de virulência também foram encontrados por Ahmad et al. (2014), onde avaliaram os genes de virulência entre enterococos isolados de água do mar e de amostras de água de um rio que desembocava em uma praia da Malásia. Os genes, *gelE*, *asa*, *esp* e *cylA*, foram detectados em 100%, 63,41%, 21,95% e 7,32%, respectivamente, entre os isolados do rio. Já entre os isolados da água da praia, em proporções menores de 67,27%, 41,82%, 20%, 0%, respectivamente. Esse estudo ainda salientou que isolados positivos para estes genes de virulência em águas recreativas poderiam ser um risco para a saúde humana e de outros animais que habitam esses ambientes aquáticos.

No entanto, a presença de genes de virulência não necessariamente implica em risco à saúde do hospedeiro. Esses genes podem estar relacionados apenas ao aumento na capacidade desses micro-organismos em se instalar e colonizar o trato gastrointestinal ou se propagar para outros nichos altamente competitivos, como foi ressaltado no estudo de Santestevan et al. (2015).

### 5.6 Relação entre a presença do gene *gelE* e a produção da enzima gelatinase

Dos 158 isolados para os quais a atividade da enzima gelatinase foi investigada, somente os *E. faecalis* apresentaram atividade na frequência de 98,8% (87/88), como é possível verificar na Tabela 10. A tabela mostra a relação entre a presença do gene *gelE* e a atividade gelatinolítica entre os isolados deste estudo.

TABELA 10. Relação entre a presença do gene *gelE* e a atividade gelatinolítica entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies	Porcentagem (n) de isolados*		
	<i>gelE</i> -/gelatinase -	<i>gelE</i> +/gelatinase -	<i>gelE</i> +/gelatinase +
<b><i>E. faecalis</i></b>	1,136 % (1/88)	0% (0/88)	100% (87/87)
<b><i>E. faecium</i></b>	100% (37/37)	0% (0/37)	0% (0/37)
<b><i>E. hirae</i></b>	100% (24/24)	0% (0/24)	0% (0/24)
<b><i>E. casseliflavus</i></b>	100% (9/9)	0% (0/9)	0% (0/9)

\* (-): resultado negativo; (+): resultado positivo

Os isolados pertencentes às espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. casseliflavus* não apresentavam o gene *gelE*, como já havíamos salientado anteriormente, tampouco produziram gelatinase. Apenas um isolado de *E. faecalis*, da amostra T2, não apresentou nem gene *gelE*, nem a atividade da gelatinase; como pode ser observado na Tabela 10.

Embora sejam escassos os trabalhos que avaliam fatores de virulência em enterococos isolados de tartarugas marinhas, bem como, no ambiente marinho. Outros estudos com enterococos isolados de diversos

nichos tem relatado a presença do gene *ge/E* e a atividade gelatinolítica. Jiménez (2013) avaliaram amostras de suínos, caninos, ovinos e felinos e obtiveram 15 isolados de *E. faecalis*, destes, 13 isolados possuíam o gene *ge/E*, e 12 apresentaram resultado positivo para a atividade da gelatinase.

Di Cesare et al. (2014) compararam enterococos isolados de ambiente marinho com isolados clínicos quanto a presença de fatores de virulência e embora a frequência, no ambiente marinho tenha sido menor, ainda foi possível isolar enterococos positivos para *ge/E*. Di Cesare et al. (2014) ainda concluíram que estes achados precisam ser corroborados por estudos mais amplos. Contudo, eles indicam que, embora em baixas frequências, os enterococos resistentes a antimicrobiano, abrigando vários genes de virulência podem ser encontradas no ambiente marinho.

Klibi et al. (2015) determinaram a diversidade genética em enterococos recuperados a partir de amostras de fezes de animais produtores de alimentos (aves, bovinos e ovinos) na Tunísia. Dos isolados encontrados, 11,5% carregava o gene *ge/E* e apresentavam a atividade gelatinolítica. Em outro estudo investigaram a presença de determinantes de virulência em enterococos isolados de fezes de cães e gatos saudáveis, e observaram que o gene *ge/E* foi positivo em 62,6%, mas apenas 26,1% eram gelatinase positivo, sugerindo a existência de genes silenciosos (Iseppi, 2015).

### 5.7 Relação entre a presença do gene *cylA* e a atividade da citolisina

A expressão da citolisina foi avaliada somente para os isolados positivos para o gene *cylA*. Dos 36 *E. faecalis cylA* positivos, 16 foram também positivos para a expressão da enzima citolisina, já em 17 *E. faecalis* positivos para o gene, não foi possível detectar a expressão da enzima citolisina, uma vez que não foi verificada hemólise em meio ágar sangue (Tabela 11).

TABELA 11. Relação entre a presença do gene *cylA* e a atividade da enzima citolisina entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies	Porcentagem (n) de isolados*		
	<i>cylA</i> -/citolisina -	<i>cylA</i> +/citolisina -	<i>cylA</i> +/citolisina +
<i>E. faecalis</i>	59,1% (52/88)	19,3% (17/88)	21,6% (19/88)
<i>E. faecium</i>	100% (37/37)	0% (0/37)	0% (0/37)
<i>E. hirae</i>	100% (24/24)	0% (0/24)	0% (0/24)
<i>E. casseliflavus</i>	100% (9/9)	0% (0/9)	0% (0/9)

\* (-): resultado negativo; (+): resultado positivo

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 (Coburn & Gilmore, 2003). 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 isolados de 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).

Jiménez et al. (2013) avaliaram amostras de suínos, caninos, ovinos e felinos e obtiveram 15 isolados de *E. faecalis*, destes, 7 isolados possuíam o gene *cyIA* e apresentaram resultado positivo para a atividade da citolisina. Iseppi et al. (2015) investigaram a presença de determinantes de virulência em enterococos isolados de fezes de cães e gatos saudáveis e apesar da beta-hemólise não estar presente no isolados testados, 15 enterococos (13%) foram positivos para o gene *cyIA*.

Em 17 dos 36 enterococos positivos para o gene *cyIA*, isolados de tartarugas marinhas 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) 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 a atividade de citolisa em alguns isolados de tartarugas marinhas. Assim sendo, tanto quanto identificar o operon *cy/* completo, avaliar a atividade citolítica nos demais enterococos pode apontar diferentes mecanismos associados.

## **5.8 Capacidade de formação de biofilme in vitro**

Mudanças na fisiologia do crescimento de células planctônicas influenciam na formação do biofilme. Essas células passam a se organizar em comunidades onde a comunicação entre as células é responsável por coordenar a expressão de genes e a atividade metabólica do biofilme (Dunny et al., 2014). A capacidade de formar biofilme em enterococos é uma característica de virulência importante (Mohamed & Huang, 2007).

A preocupação em biofilmes formados por enterococos clínicos se deve principalmente ao fato de que, quando apresentam esse fenótipo, eles aumentam a sua resistência aos antimicrobianos (Mohamed & Huang, 2007; Medeiros et al., 2013). Já na indústria, os biofilmes formados por enterococos associados a alimentos são um problema, uma vez que esses microorganismos podem aderir à superfície de equipamentos de processamento de alimentos, tornando-os fontes de contaminação, além de apresentarem uma

maior resistência a sanitizantes (Cassenege et al., 2013; Fernandes et al., 2015).

Estudos sobre a formação de biofilme por enterococos isolados do ambiente marinho ainda são escassas (Asmat et al., 2014). Com o objetivo de ampliar os dados relativos a essa temática, os 158 enterococos deste estudo foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Os resultados estão expressos na Tabela 12.

TABELA 12. Capacidade de formação de biofilme das diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de tartarugas marinhas encontradas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

<b>Número (%) dos isolados com capacidade de formação de biofilme</b>				
<b>Espécies (n)</b>	<b>Forte</b>	<b>Moderado</b>	<b>Fraco</b>	<b>Não formador</b>
<i>E. faecalis</i> (88)	2 (2,3%)	44 (50%)	30 (34,1%)	12 (13,6%)
<i>E. faecium</i> (37)	-	10 (27,1%)	6 (16,2%)	21 (56,7%)
<i>E. hirae</i> (24)	-	-	-	24 (100%)
<i>E. casseliflavus</i> (9)	-	1 (11,1%)	1 (11,1%)	7 (77,8%)
<b>Total (158)</b>	<b>2 (1,3%)</b>	<b>55 (34,8%)</b>	<b>37 (23,4%)</b>	<b>64 (40,5%)</b>

n= número de isolados de cada espécie

Os enterococos avaliados se mostraram, na sua maioria, não formadores (64/158), moderados (55/158); fracos (37/158) formadores de biofilme. Apenas dois isolados da espécie *E. faecalis* foram classificados como forte formador de biofilme.

Em relação as espécies, moderada e fraca capacidade de formação de biofilme foram os fenótipos mais amplamente distribuídos entre a espécie *E. faecalis*. Cerca de 50% (44/88) dos *E. faecalis* foram moderados e 34,1% (30/88), fraco formadores de biofilme. *Enterococcus hirae* foi a espécie que não

apresentou capacidade de formação de biofilme. *Enterococcus faecium* e *E. casseliflavus* foram, em sua maioria, não formadores de biofilme. Onde 56,7% (21/37) dos *E. faecium* e 77,8% (7/9) dos *E. casseliflavus* foram classificados como não formadores biofilme nas microplacas.

Em uma revisão sobre biofilmes, Mohamed & Huang (2007), destacaram que *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente relatada na formação de biofilme quando comparadas com outras espécies de enterococos e que a formação de biofilmes pode ser um fator importante na patogênese desses enterococos. A capacidade dessas bactérias em formar biofilme pode contribuir para a sobrevivência, para a persistência e para a dispersão de genes de virulência e/ou resistência em diversos nichos ambientais, bem como pode favorecer patogêneses nos diferentes hospedeiros. Em contrapartida, Dunny et al. (2014) salientam o cuidado ao se associar a formação de biofilme a patogêneses, uma vez que nem sempre os ensaios laboratoriais refletem de perto as condições de um hospedeiro humano ou animal.

Tsikrikonis et al. (2012) investigaram a formação de biofilme em isolados de enterococos obtidos de fezes humanas e animais. Observaram que a formação de biofilme é significativamente maior entre os isolados de humanos do que em isolados animais. Além disso, verificaram que a produção de gelatinase teve associação significativa com formação de biofilme principalmente em *E. faecalis* obtidos de animais. Trabalhos publicados sobre a produção de biofilme por *Enterococcus* oriundos de fezes de animais corroboram com os resultados encontrados neste estudo com tartarugas marinhas.

A gelatinase, segundo alguns autores, também pode contribuir para a formação de biofilme (Medeiros et al., 2013; Ahmad et al., 2014). Contudo, essa ainda é uma questão controversa, pois outros estudos não verificaram correlação entre a expressão de gelatinase e a formação de biofilme (Mohamed & Murray, 2005; Marra et al., 2007). Outros estudos salientam que a expressão do gene *asa* tem um efeito importante sobre a formação de biofilme, uma vez que promove a agregação de micro-organismos aderentes a uma superfície (Chuang-Smith et al., 2010; Dunny et al., 2014).

A capacidade de formar biofilme entre enterococos obtidos de uma praia da Malásia foi avaliada por Ahmad et al., (2014). A formação de biofilme foi maior entre isolados da areia (61,54%), seguido por água da praia (31,58%) e água de um rio que desembocava na praia (22,73%). Além disso, a formação de biofilme foi significativamente associada com a presença dos genes *asa* e *gelE* (Ahmad et al., 2014).

Porém, no presente estudo, não parece haver uma relação entre a presença dos genes *gelE* e *asa* com a formação de biofilme, visto que, embora os isolados que apresentaram um dos genes ou os dois genes, foram capazes de formar biofilme; o contrário também foi observado, a ausência dos genes em espécies formadoras de biofilme, bem como a presença dos genes (*gelE* e *asa*) e a não formação de biofilme em outros isolados. Diversos estudos têm salientado que esse fenótipo é multifatorial e depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam juntos. Além disso, vários outros genes, além dos estudados neste trabalho, têm sido relatados como importantes na formação de biofilme em enterococos, o que confirma a complexidade e a

natureza multifatorial dessa característica (Mohamed & Murray, 2005; Mohamed & Huang, 2007; Chuang-Smith et al., 2010; Tsirikonis et al., 2012; Cassenego et al., 2013; Asmat et al., 2014; Dunny et al., 2014).

### **5.9 Diversidade genotípica pela análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Reconhecido como uma técnica padrão ouro para verificar a relação clonal de muitas linhagens de enterococos, o PFGE (eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado) é um método de tipagem que permite o estudo da disseminação dos enterococos em diferentes hospedeiros e ambientes (Saeedi et al., 2002; Magalhães et al., 2005; Teixeira et al., 2011; Werner 2015). O PFGE auxilia no entendimento da estrutura populacional, da evolução de linhagens multirresistentes e virulentas, e da emergência e dispersão global de certos clones responsáveis por surtos causados por esse gênero (Camargo et al., 2008; d'Azevedo et al., 2008; Teixeira & Merquior, 2013; Werner 2015).

Dos 60 isolados selecionados, inicialmente, 6 plugs não puderam ser utilizados, devido erros na metodologia, resultando em 54 perfis analisados. A análise por PFGE dos 54 isolados revelou diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico distribuídos em 10 perfis clonais (PC) distintos e 4 *singletons*, formado por 4 perfis não relacionado aos demais, como pode ser observado na Figura 12. O ponto de corte para considerar as bactérias como pertencentes ao mesmo perfil clonal (PC) foram de 80% de similaridade

(Tenover et al., 1995). Cada um dos 10 perfis clonais foi constituído por enterococos de uma mesma espécie. Todos os perfis clonais formados tiveram mais de 90% de similaridade, sendo que 4 perfis clonais (o PC 4, PC 6, PC 7 e o PC 10) apresentaram 100% de similaridade.

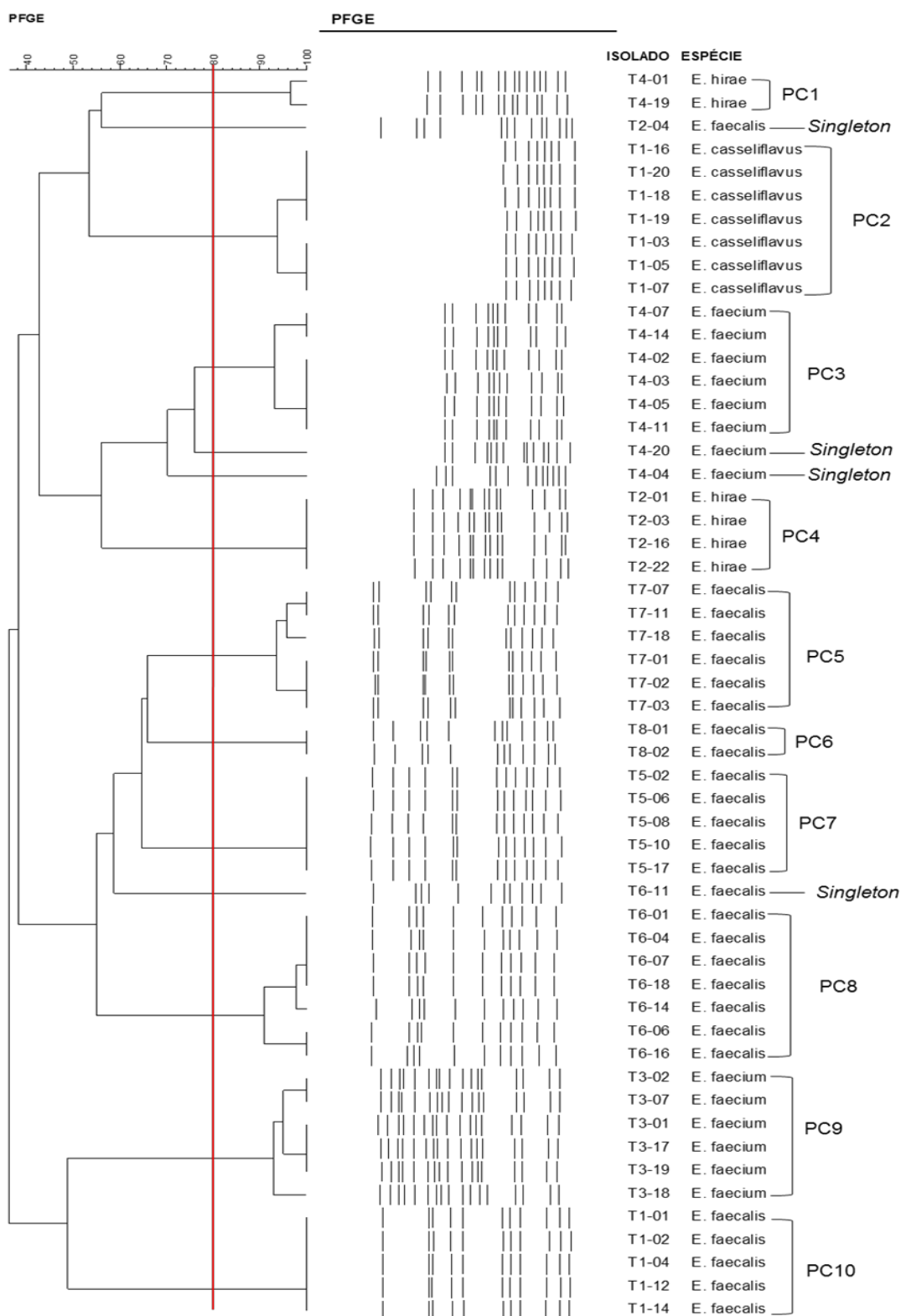


FIGURA 12: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *Sma*I, do enterococos isolados das amostras T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8, demonstrando os 10 perfis clonais (PC).



Uma relação entre o perfil clonal e a resistência foi observada. Na amostra T1 foi isolado enterococos das espécies *E. casseliflavus* e *E. faecalis* que foram agrupados em dois perfis clonais, o PC 2 e o PC 10, conforme Figura 12. O PC 2 apresentou resistência intermediária para eritromicina e rifampicina, mas nenhum dos genes de resistências testados foram encontrados. Já o PC 10 com *E. faecalis* apresentou fenótipos de resistência e resistência intermediária somente para rifampicina, como pode ser visto na Figura 13.

A amostra T2 é composta por enterococos das espécies *E. faecalis* e *E. hirae*, essa amostra gerou o PC4, com os *E. hirae* e um dos *singleton* formado pela única amostra de *E. faecalis* isolada da amostra T2 (T2-04). É importante salientar que nenhum dos dois perfis (PC 4 e o *singleton*) apresentaram resistência aos antimicrobianos (Figura13).

Já a amostra T3 é composta por espécie *E. faecium* e apresentou um único perfil clonal, o PC 9. Esse perfil clonal apresentou fenótipos de resistência a eritromicina e todos os representantes desse grupo apresentaram o gene *msrC.4*

Considerando-se a diversidade genética dentro de uma mesma espécie, analisando a amostra T4, composta pelas espécies *E. hirae* e *E. faecium*, foi encontrado dois perfis clonais, o PC 1 composto pelo *E. hirae* e o PC3 composto de *E. faecium*, além dos dois perfis clonais a amostra T4 apresentou 2 *singletons* de *E. faecium*, formado por dois perfis não relacionados aos demais, cuja similaridades foram de 76% (T4-20) e 70% (T4-04) em relação ao PC 3 (Figura 12).

Quando aos perfis de resistência aos antimicrobianos observados para esses perfis clonais, o PC 1 apresentou resistência intermediária a rifampicina; já no PC 3 observou-se fenótipos de multirresistência a rifampicina e eritromicina, bem como a presença do gene *msrC* nos isolados.

Convém ressaltar, também, que o *singleton* de *E. faecalis* da amostra T2 (T2-04) apresentou uma similaridade de 56% com o PC 1, cuja espécie era *E. hirae* isolada da amostra T4.

Em relação a amostra T5, foi possível verificar um perfil clonal, o PC 7 composto por *E. faecalis*. Já na amostra T6, que é composta apenas por espécies de *E. faecalis* foi observado um perfil clonal, o PC 8 e um *singleton* formado pela amostra T6-11 que apresentou 59% de similaridade com PC 7, composta por isolados *E. faecalis* da amostra T5.

No PC 7 foi observado alguns fenótipos de resistência intermediária a rifampicina, mostrado na Figura 13. Já no PC 8 foi observado a presença de um isolado com resistência intermediária a eritromicina (T6-14) e três isolados com resistência intermediária a rifampicina. Em ambos os perfis clonais (PC 7 e PC 8) não foram encontrados genes de resistência.

Por fim, as amostras T7 e T8 compostas de *E. faecalis* apresentaram os perfis clonais PC 5 e PC 6, respectivamente, conforme pode ser visto na Figura 12. O PC 5 foi sensível a todos os antimicrobianos testados, já o PC 6 apresentou resistência intermediária a rifampicina, conforme mostrado na Figura 13.

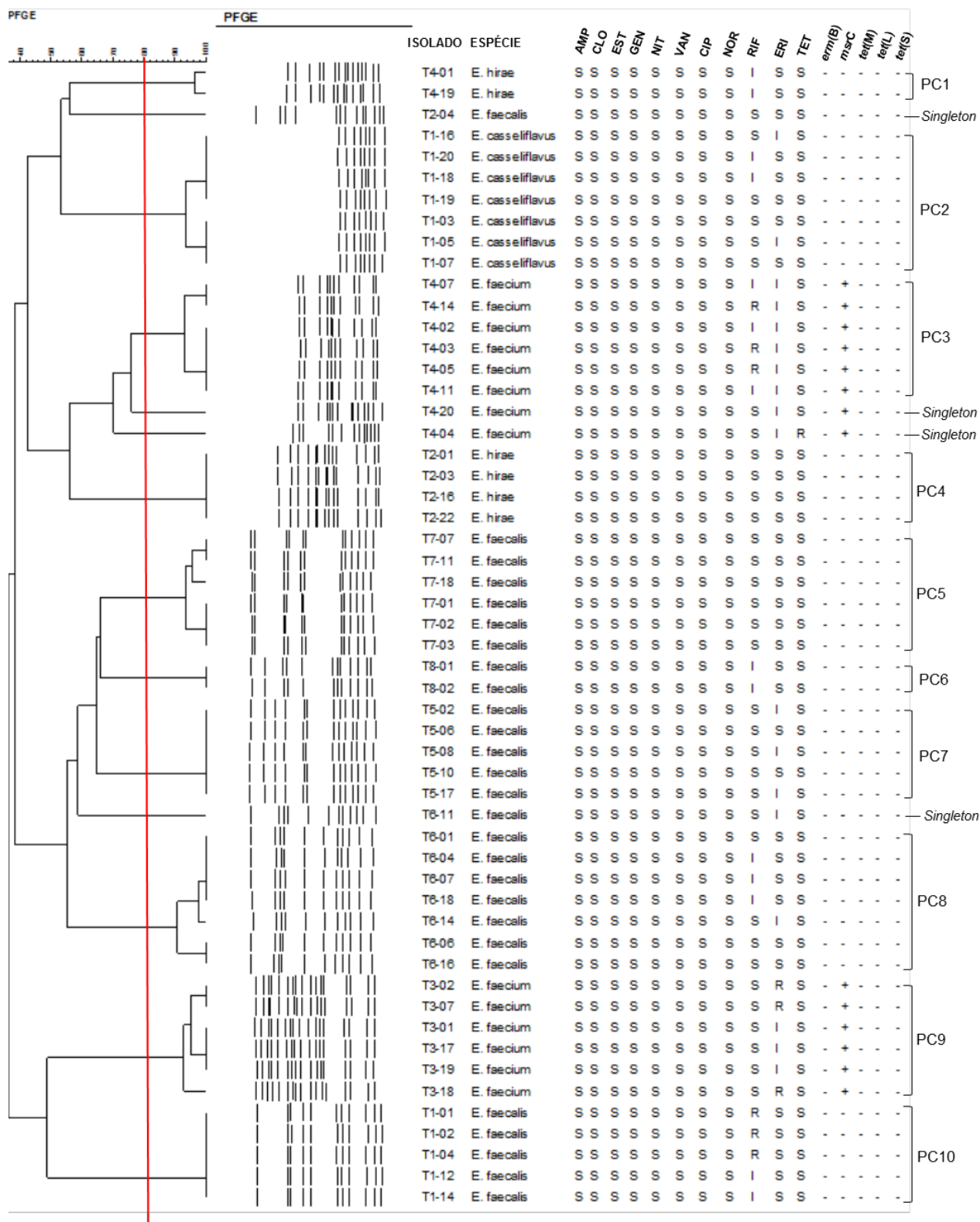


FIGURA 13: Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de resistência dos isolados de tartarugas marinhas. Fonte: A autora.

Quando relacionamos os perfis clonais com os genes de virulência, produção da gelatina, produção da citolisina e capacidade de formação de biofilme, conforme mostrado na Figura 14, é possível observar que os *E. hirae* do PC 1 não apresentaram nenhum fator de virulência, além de serem não-formadores de biofilme.

Os *E. casseliflavus* do PC 2 também não apresentaram genes de virulência. Em relação à formação de biofilme, os isolados foram, em sua maioria, não-formador embora um isolado tenha sido moderado formador de biofilme (T1-03), conforme Figura 14.

Os perfis clonais PC 3, PC 4 e os dois *singletons* (T4-20 e T4-04) não apresentaram fatores de virulência, nem capacidade de formação de biofilme. Já os PC 5, PC 6, PC 7, PC 8 e PC 10 foram os que mais abrigaram genes de virulência. Todos os *E. faecalis* do PC 5 apresentaram os genes *ace*, *asa*, *geE*, além disso todos os isolados foram positivos para a produção da gelatinase. Em relação a formação de biofilme, os isolados foram fracos e moderados formadores.

O PC 6 também foi positivo para os genes *ace*, *asa*, *geE* e produziram gelatinase. Já o PC 7 foi positivo para os genes *ace*, *geE*, produziram gelatinase e foram moderados formadores de biofilme. O *singleton* T6-11 *E. faecalis* foi positivo para todos os genes de virulência testados, bem como produziu gelatinase e citolisina, mas não foi capaz de formar biofilme.

O PC 8 composto por *E. faecalis* isolados da amostra T6 foi positiva para todos os genes de virulência testados (*cylA*, *ace*, *asa* e *geE*), bem como positivo para a produção de gelatinase e citolisina. Em relação a formação de

biofilme, os isolados foram moderados, fracos e não formadores de biofilme, conforme Figura 14.

Os isolados pertencentes ao PC 9 foram negativo para os genes de virulência testados, bem como suas provas fenotípicas de gelatinase e citolisina, porém, perfis de moderado, fraco e não formadores de biofilme foram observados.

Todos os *E. faecalis* do PC 10 foram positivos para o gene *gelE* e sua prova fenotípica para a gelatinase, 4 dos 5 isolados desse grupo foram, ainda, positivos para o gene *ace*. Em relação a formação de biofilme, os isolados foram moderados, fracos e não formadores.

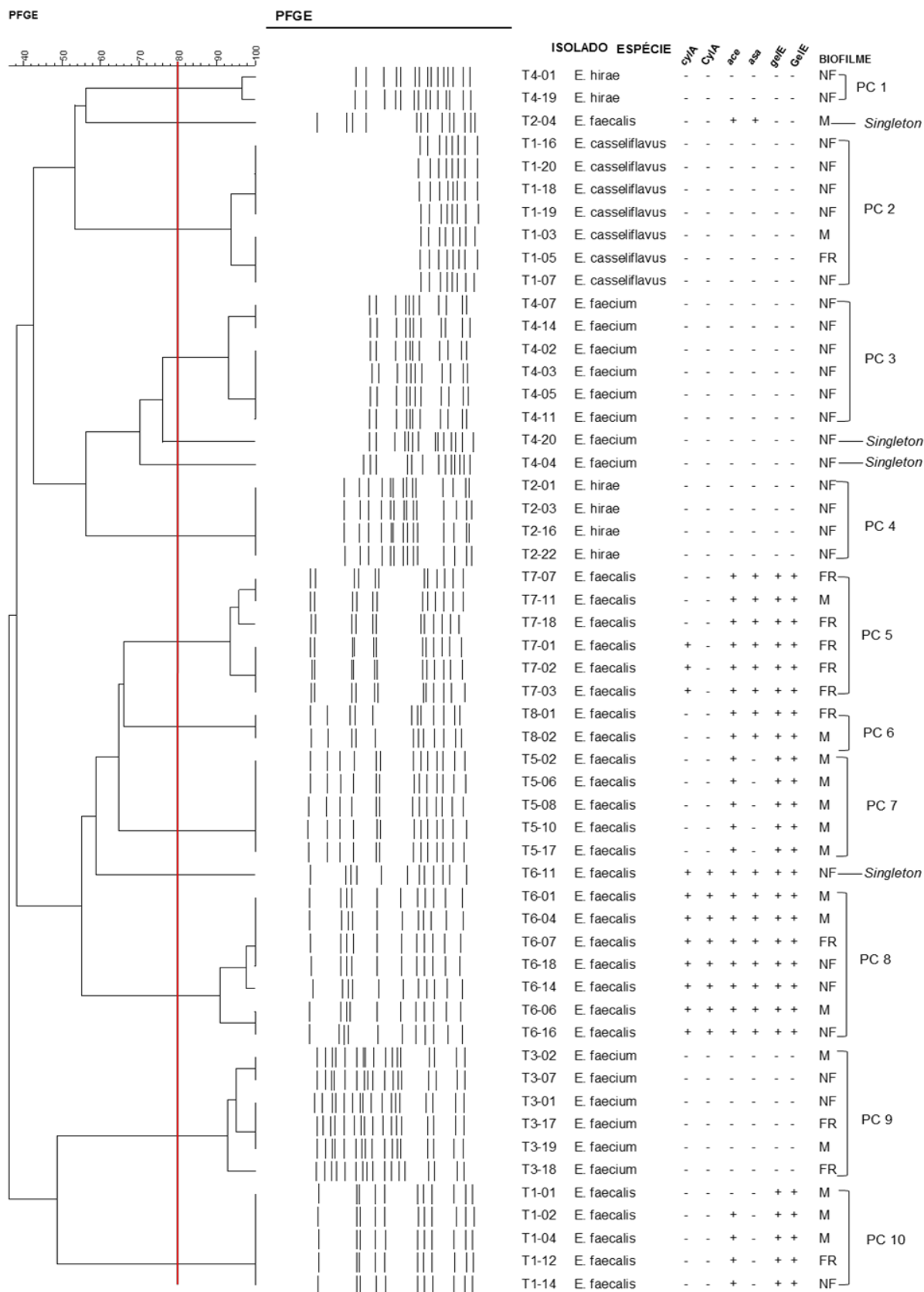


FIGURA 14: Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos do PFGE, genes de virulência, produção de gelatinase (GelE), produção de citolisina (CylA) e capacidade de formação de biofilme dos isolados de enterococos de tartarugas marinhas.

Assim como neste estudo, outros trabalhos demonstraram que a técnica de PFGE é uma ferramenta eficaz para a discriminação de bactérias isoladas do ambiente marinho (Jensen et al., 1999; Stoddard et al., 2008; Furukawa et al., 2011). Estudos com animais terrestres também salientam a eficiência do PFGE em discriminar linhagens de enterococos resistentes e virulentas (Jung et al., 2007; Jackson et al., 2010; Wijetunge et al., 2012; Jiménez et al., 2013; Oravcova et al., 2014).

Segundo Magalhães et al. (2005) o PFGE é uma técnica bastante complexa e com um poder discriminatório alto, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas. Nesse sentido, destaca a importância de correlacionar os dados gerados por diferentes técnicas (fenotípicas e genotípicas) para se inferir resultados mais precisos (Magalhães et al., 2005).

Os resultados obtidos do PFGE demonstraram que há relações entre os perfis agrupados por PFGE e os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, genes de resistência e virulência, além daquelas já estabelecidas entre amostras e espécies. No entanto, não foi possível correlacionar com a formação de biofilme. Como já foi mencionado anteriormente, esse fenótipo pode ser influenciado por uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam juntos na determinação dessa característica. Isso pode justificar os diferentes fenótipos gerados mesmo em cepas pertencentes a um mesmo perfil clonal (Mohamed & Huang, 2007).

A espécie de *E. faecalis* tem se mostrado bem adaptada ao trato gastrointestinal de animais marinhos. Spence (2014) salienta que a espécie *E.*

*faecalis* é ubíqua a vários ambientes e um clone dessa espécie foi predominante em amostras de fezes dos animais marinhos avaliadas na Antártica (tais como focas, elefantes, pinguins-de-adelia e outros). Santestevan et al. (2015) encontraram o predomínio de *E. faecalis* em amostras de fezes de lobos-marinhos e alta similaridade entre isolados de uma mesma amostra. Prichula (2015) analisando enterococos em pinguins-de-magalhães, também encontrou alta prevalência de *E. faecalis* bem como similaridade entre os isolados de mesma amostra, através do PFGE; como foi visto no presente estudo.

É importante ressaltar que contrastes na ocorrência e prevalência de espécies, bem como de clones encontrados nas amostras avaliadas podem estar relacionados a uma série de fatores, tais como idade, estado de saúde, composição da dieta e/ou o caminho migratório percorrido pelo animal ao longo da vida (Lebreton et al., 2014).

O sequenciamento do genoma de diversas cepas de enterococos e a utilização de diferentes técnicas como a amplificação aleatória de fragmentos de DNA (RAPD), tipagem por sequenciamento de múltiplos loci (MLST) e análise do polimorfismo numérico de sequências repetitivas em múltiplos loci (MLVA) têm sido aplicados tanto para identificar as linhagens envolvidas em epidemias e infecções quanto para avaliar a similaridade entre isolados de diferentes nichos ecológicos (Lebreton et al., 2014; Werner, 2015).

Apesar de o PFGE ser a técnica padrão ouro para tipagem de enterococos, técnicas, como MLST e MLVA, têm sido utilizadas para rastrear clones epidemiológicos em ambientes aquáticos (Ahmad et al., 2014; Sadowy



& Luczkiewicz, 2014). As principais vantagens desses sistemas são, como no PFGE, a boa tipabilidade das amostras, a reprodutibilidade e o poder discriminatório, tendo a vantagem, em relação à técnica anterior, de permitir comparações em nível global das amostras caracterizadas em bancos de dados internacionais de acesso *online* (Kem et al. 2011).

Sadowy & Luczkiewicz (2014), em um estudo realizado na Polônia, avaliaram amostras de água (estações de tratamento de esgoto, rio e mar) e encontraram isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* que apresentavam vários determinantes de resistência e virulência característicos de linhagens hospitalares. Os autores observaram também relações clonais entre os isolados dos diferentes pontos de amostragem e concluíram que as estações de tratamento liberam enterococos resistentes e virulentos para os emissários submarinos e salientam a necessidade da compreensão de como essas linhagens sobrevivem e se proliferam em ecossistemas aquáticos.

Said et al. (2015) em um estudo realizado na Tunísia com amostras de águas residuais. Foi encontrado através do PFGE 32 perfis diferentes de enterococos com altos níveis de resistência a aminoglicosídeos. Os autores sugerem que a água pode representar uma fonte importante para a disseminação desses micro-organismos resistentes a antimicrobianos para outros ambientes.

Veljovic et al., 2015 investigaram a prevalência de enterococos resistentes a antimicrobianos em Belgrado na Sérvia. Da análise do PFGE revelou semelhanças genômicas que variaram de 75 a 100%. Este estudo

indicou a importância do impacto antropogênico à propagação de enterococos resistentes a antimicrobianos em águas ambientais de Belgrado na Sérvia.

O sequenciamento de todo o genoma do micro-organismo pode explicar ainda melhor a origem de genes de resistência a antimicrobianos e virulência e permitir a atribuição das devidas fontes. Estudos têm demonstrado que cepas ambientais têm um genoma menor quando comparadas com isolados clínicos, e os trabalhos sugerem que isso ocorre devido à presença de genes chamados CRISPR (*Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*). Esses genes seriam responsáveis por impedir as bactérias (portadoras de CRISPRs) de trocar material genético através de fagos ou plasmídeos com outras bactérias, funcionando como um “sistema de defesa” contra a aquisição de desse tipo de material genético, e conseqüentemente essas bactérias apresentariam um genoma menor. As pesquisas demonstram que esses genes são mais encontrados em bactérias ambientais do que em isolados clínicos (Gilmore et al., 2013).

Em contrapartida, as estirpes que não possuem os elementos CRISPRs são capazes de adquirir sequências de inserção e elementos genéticos que confere virulência aumentada e resistência aos antimicrobianos, o que resulta em aumento patogenicidade. Estas estirpes de *Enterococcus* parecem ter perdido durante o processo evolutivo os genes associados com o nicho gastrointestinal de comensais e movendo-se em direção a um nicho de patogenicidade. Há fortes evidências de uma associação entre a acumulação de sequências de inserção e aumento da virulência dos enterococos (Gilmore et al., 2013; Spence, 2014).

Sob essa perspectiva, o sequenciamento de genes constitutivos (MLST) ou do genoma completo poderia esclarecer se as linhagens de enterococos resistentes e virulentas encontradas no trato gastrointestinal de tartarugas marinhas podem estar relacionadas a complexos clonais conhecidos mundialmente por causar surtos hospitalares, constituindo, assim, um potencial risco à saúde dos próprios animais, de humanos e/ou ao ambiente marinho em geral.

Neste sentido, os resultados do nosso estudo enfatizam a importância da caracterização de cepas de enterococos oriundas de tartarugas marinhas. Dessa forma, é possível compreender melhor a ecologia das tartarugas marinhas, bem como elucidar a trajetória de propagação de linhagens bacterianas resistentes e virulentas oriundas desses animais nos ecossistemas marinhos.

## 6 CONCLUSÃO

Através desse estudo, foi possível isolar bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* de amostras fecais de tartarugas marinhas. Com a técnica de PCR espécie-específicos, foi possível realizar a identificação dos enterococos. Observou-se que as espécies predominantes nas amostras avaliadas foram *E. faecalis* e *E. faecium*, seguidas de *E. hirae* e *E. casseliflavus*.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos demonstrou que os enterococos encontrados no trato gastrointestinal de tartarugas marinhas foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados. No entanto, fenótipos de resistência foram encontrados para eritromicina, rifampicina e tetraciclina. Entre as espécies de enterococos, *E. faecium* foi a espécie mais resistente aos antimicrobianos avaliados, apresentando inclusive alguns fenótipos de multirresistência. O único isolado resistente à tetraciclina não apresentou os genes *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(S)*. Em alguns isolados com resistência a eritromicina foi encontrado o gene *msrC*, já o gene *erm(B)* não foi detectado nos isolados resistentes à eritromicina. Esses resultados apontam para a importância de mais estudos com esses animais para o melhor entendimento da evolução dos

mecanismos de resistência apresentados pelo gênero enterococos.

Os genes *cyIA*, *gelE*, *ace* e *asa*, envolvidos na virulência de enterococos, foram detectados, exclusivamente na espécie *E. faecalis*. Além disso, verificou-se que alguns desses genes de virulência, tais como o gene *gelE* e *cyIA* estavam sendo expressos em alguns isolados, acarretando na atividade da gelatinase e da citolisina, respectivamente.

Quanto à capacidade de formação de biofilme, houve diferenças na formação de acordo com as espécies de enterococos avaliadas, no entanto a maioria dos isolados se mostrou não formador de biofilme. Além disso, a formação de biofilme em *Enterococcus* spp. não pareceu estar relacionada a nenhum dos genes avaliados neste trabalho, o que confirma a complexidade e a natureza multifatorial dessa característica.

Com relação a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico dos enterococos foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE) e demonstrou uma alta clonalidade entre os isolados de uma mesma amostra. Além disso, foi possível estabelecer relação entre os perfis clonais gerados por PFGE e os fatores de virulência presentes nos isolados de enterococos.

Os resultados obtidos neste estudo ressaltam a distribuição de genes de virulência e/ou resistência a antimicrobianos entre espécies de enterococos que compõem o trato gastrointestinal de tartarugas marinhas. Isso indica que estes enterococos podem constituir um reservatório desses genes; e, sendo o ecossistema marinho um meio de disseminação, é importante considerar o potencial desse gênero em ocasionar riscos à saúde desses

animais, bem como para outros organismos que compartilham o mesmo ambiente. Portanto, o estudo contribui para a compreensão da ecologia das tartarugas marinhas, bem como para a elucidação da trajetória de propagação de linhagens bacterianas nesse ambiente.

## 7 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. 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, n.2, p.127-137, 2000.

ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; MOLINOS, A. C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTÍNEZ-VIDEIRA, P. 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. *Int. J. Food Microbiol.*, v.123, p.38 – 43, 2008.

ACKERMAN, R. A. The nest environment and the embryonic development of sea turtles. in: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.). *The biology of sea turtles*. CRC Press. p.83-106, 1997.

AHMAD, A.; DADA, A. C.; USUP, G.; HENG, L. Y. Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. *Mar. Pollut. Bull.*, v.82, n.1-2, p.26-38, 2014.

AL-BAHRY, S. N.; MAHMOUD, I. Y.; AL-BELUSHI, K. I.; ELSHAFIE, A. E.; AL-HARTHY, A.; BAKHEIT, C. K. Coastal sewage discharge and its impact on fish whit reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chem.*, v.77, n.11, p.1534-1539, Dec. 2009.

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

ALIFANO, P.; PALUMBO, C.; PASANISI, D.; TALÀ, A. Rifampicin-resistance, *rpoB* polymorphim and RNA polymerase genetic engineering. *J. Biotechnol.*, v.202, p.60-77, 2015.

ALMEIDA, DE P. A.; SANTOS, A. J. B.; THOMÉ, J. C. A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, C.; MARCOVALDI, M. Â.; SANTOS, A. S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Rev. Biodivers. Bras. Ano i*, n.1, p.12-19, 2011.

ANDREWS, J.; ASHBY, J.; JEVON, G.; MARSHALL, T.; LINES, N.; WISE, R.; A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998. *J. Antimicrob. Chem.*, v.20, p. 285-293, 2000.

ANGST, D. C. and HALL, A. R. The cost of antibiotic resistance depends on evolutionary history in *Escherichia coli*. *BMC Evolution. Biol.*, v.13, p.163-170, 2013.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Disponível em: [www.anp.gov.br/meio/guias/sismica/refere/tartaruga.pdf](http://www.anp.gov.br/meio/guias/sismica/refere/tartaruga.pdf) Acessado em: 28 jan 2016.

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

ASMAT, A.; DADA, A. C.; GIRES, U. Biofilm formation, *gel* and *esp* gene carriage among recreational beach enterococci. *Glob. J. Health Sci.*, v.6, n.5, 2014.

AWABDI, R. D.; SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A. P. M. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Chelonia mydas* (L.1758), na costa Leste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Biotemas*, 26(1), 2013.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends. Microbiol.*, v.14, p.176–182, 2006.

BALAZS, G. H. Status of sea turtles in the central Pacific ocean. in: BJORN DAL, K. A. (ed.). *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Washington Dc: Smithsonian Institution Press, p. 243-252, 1982.

BARROS, J.; IGREJAS, G.; ANDRADE, M.; RADHOUANI, H., LÓPEZ, M., TORRES, C.; POETA, P. Gilthead seabram (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? *Mar. Pollut. Bull.*, v.62, n.6, p.1245-1248, 2011.

BARROS, K. V. S.; ROCHA-BARREIRA, C. A.; MAGALÃES, K. M. Ecology of Brazilian seagrasses: is our current knowledge sufficient to make sound decisions about mitigating the effects of climate change? *Iheringia Sér. Bot.*, v.68, p.155-170, 2013.

BAQUERO, J.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.19, n.3, p.260-265, 2008.

BELLINI, C. and SANCHES, T. M. Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Mar. Turt. Newsl.*, n.74, p.12-13, 1996.



BELLINI, C.; SANCHES, T. M.; FORMIA, A. Hawksbill turtle tagged in Brazil captured in Gabon, Africa. *Mar. Turt. Newsl.*, n.87, p.11-12, 2000.

BENNANI, M.; AMAROUCH, H.; OUBRIM, N.; COHEN, N. Identification and antimicrobial resistance of fecal Enterococci isolated in Coastal Mediterranean environments of Morocco. *Eur. J. Sci. Res.*, 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.

BESSA, L. J.; BARBOSA-VASCONCELOS, A.; MENDES, A.; VAZ-PIRES, P.; COSTA, P. M. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. *J. Water Health*, v.12, p. 426-435, 2014.

BJORNDAL, K. A. and ZUG, G. R. Growth and Age of Sea Turtles. in: BJORNDAL, K. A. (ed.) *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Washington Dc: Smithsonian Institution Press., p.599-600, 1995.

BOWEN, B. W. and KARL, S. A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.*, v.16, p.4886–4907, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Biodiversidade Aquática. Zona Costeira e Marinha. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

BRASÍLIA. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil / Secretaria de Biodiversidade e Florestas/Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros. – Brasília: MMA/SBF/GBA, 148 p.; 29 cm, 2010.

BRASÍLIA. Plano de ação nacional para a conservação das Tartarugas marinhas. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade, ICMBIO, 2011.

BRITO, F. L. C.; MAIA, F. C. L.; FRANÇA, L. M. O.; ALBUQUERQUE, A. R.; SANTOS, R. A. M.; CAVALCANTI, M. A. M.; GUIMARÃES, E. S. G. Fibropapillomatosis and multiple fibromas in a green turtle from the south coast of Pernambuco State, Brazil. *Mar. Turt. Newsl.*, n.106, p.12, 2004.

BRODERICK, A. C.; FRAUENSTEIN, R.; GLEN, F.; HAYS, G. C.; JACKSON, A. L.; PELEMBE, T.; RUXTON, D. G.; GODLEY, B. J. Are green turtles globally endangered? *Glob. Ecol. Biogeo.*, v.15 (1), p.21–26, 2006.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, v.42, p.1330-1334, 2001.

BUGONI, L.; NEVES, T. S.; LEITE JR., N. O.; CARVALHO, D.; SALES, G.; FURNESS, R. W.; STEIN, C. E.; PEPPE, F. V.; GIFONNI, B. B.; MONTEIRO, D. S. Potencial bicatch of sea birds and turtles in hook-and-line fisheries of the itaipava fleet, Brazil. *Fish. Res.*, v.90, p.217-224, 2008.

BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z.R.; HARWOOD, V. J. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.76, n.4, p.685-706, 2012.

CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin – susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.273-278, 2008.

CARR, A. impact of nondegradable marine debris on the ecology and survival outlook of sea turtles. *Mar. Pollut. Bull.*, v.18, p.352-356, 1987.

CASALE, P. Incidental catch of marine turtles in the Mediterranean Sea: captures, mortality, priorities. Rome, Italy, 2008.

CASSENEGO, A. P. V.; ELLWANGER, J.; d'AZEVEDO, P. A.; RIBEIRO A. M. L.; FRAZZON J.; FRAZZON, A. P. G. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de *swabs* cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.1433-1440, 2013.

CATRY, P.; BARBOSA, C.; PARIS, B.; INDJAI, B.; ALMEIDA, A.; LIMOGES, B.; SILVA, C.; PEREIRA, H. Status, ecology, and conservation of sea turtles in Guinea-bissau. *Chelonian Conserv. Biol.*, n.8, p.50–160, 2009.

CATTOIR, V. and LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 68, n.4, p.731-742, 2013.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Rev. Liber.*, v.11, p.89-118, 2010.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta (Georgia): U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

CECLIMAR – CENTRO DE ESTUDOS COSTEIROS, LIMNOLÓGICOS E MARINHOS. Instituto de Biociências (UFRGS), Imbé (RS). Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira/tartarugas-marinhas>. Acesso em: 21 jan. 2016.

CHALOUPKA, M.; BJORNDA, K. A.; BALAZS, G. H.; BOLTEN, A. B.; BOLTEN, EHRHART, L. M.; LIMPUS, C. J.; SUGANUMA, H.; TROËNG, S.; YAMAGUCHI, M. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine mega herbivore. *Glob.Ecol. Biogeo.*, n.17, p.297-304, 2008.

CHALOUPKA, M. and LIMPUS, C. Robust statistical modelling of hawksbill sea turtle growth rates (southern Great barrier Reef). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, n.146, p.1-8, 1997.

CHAN, E. H. and LIEW, H. C. A review of the effects of oil-based activities and oil pollution on sea turtles, p.159-168. in: SASEKUMAR, A.; D'CRUZ, R.; (eds.), *Thirty Years of marine Science Research and Development. Proc. 11th Annual Seminar, Malaysian Society of Marine Sciences, 26 march 1988. Kuala Lumpur, Malaysia, 1988.*

CHATTO, R.; GUINEA, M. L.; CONWAY, S. Sea turtles killed by flotsam in northern Australia. *Mar. Turt. Newsl.*, n.69, p.17-18, 1995.

CHEN, G.; JEFFREY, P. D.; FUQUA, C.; SHI, Y.; CHEN, L. Structural basis for antiactivation in bacterial quorum sensing. *PNAS*, [S.I.], v.04, n.42, p.16474-16479, 2007.

CHENG, S.; MCCLESKEY, F .K.; GRESS, M. J.; PETROZIELLO, J .M.; LIU, R.; NAMDARI, H.; BENINGA, K.; SALMEN, A.; DEL VECCHIO, V. G.. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.5, p.1248-1250, 1997.

CHUANG-SMITH, O. N.; WELLS, C. L.; HENRY-STANLEY, M. J.; DUNNY, G. M. Acceleration of *Enterococcus faecium* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS One*, v.5, n.12, 2010.

CIRM. Comissão Interministerial para os Recursos do Mar. Disponível em <<https://www.mar.mil.br/secirm/portugues/gerco.html>>. Acesso em 20 jan 2016.

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

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, Wayne (PA, USA), 2014.

COBURN, P. S. and GILMORE, M. S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell. Microbiol.*, v.5, n.10, p.661-669, 2003.

COBURN, P. S.; HANCOCK, L. E.; BOOTH, M. C.; GILMORE, M. S. A Novel Means of Self-Protection, Unrelated to Toxin Activation, Confers Immunity to the Bactericidal Effects of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Infec. Immu.*, v.67, n.7, p.3339-3347, 1999.

COELHO, A. L. S. Análise dos enalhes de tartarugas-marinhas (Reptilia: Testudines), ocorridos no litoral sul da Bahia, Brasil. 2009. 70 p. (Dissertação de mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2009.

DADA, A. C; AHMAD, A.; USUP, G.; HENG, L. Y. Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environ. Monit. Assess*, v.185, p.1583-1599, 2013.

d'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.48, n.1, p.11-16, 2006.

DAVIES, TW; DUFFY, JP; BENNIE, J; GASTON, HJ. The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution. *Front. Ecol. Environ.*, v.12(6), p.347–355, 2014.

d'AZEVEDO, P. A. ; FURTADO, G. H.; MEDEIROS, E. A.; SANTIAGO, K. A.; SILBERT, S.; PIGNATARI, A. C. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.50, n.4, p.195-198, 2008.

DELGROSSO, M., IANNELLI, F., MESSINA, C., SANTAGATI, M., PETROSILLO, N., STEFANI, S., POZZI, G., PANTOSTI, A. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol*, v.40, p.774–778, 2002.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.12, p.5857-5860, 2004.

DEVRIESE, L. A.; CHIERS, K.; DE HERDT, P.; VANROMPAY, D.; DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Enterococcus hirae* infections in psittacine birds: Epidemiological, pathological and bacteriological observations, *Avian. Pathol.*, v.24, n.3, p.523-531, 1995.

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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, n.24, p.8033–8043, 2010.

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

DI CESARE, A.; VIGNAROLI, C.; LUNA, G. M.; PASQUAROLI, S.; BIAVASCO, F. Antibiotic-resistant enterococci in seawater and sediments from a coastal fish farm. *Microb. Drug. Resist.*, v.18, p.502–509, 2012.

DI CESARE, A.; LUNA, G. M.; VIGNAROLI, C.; PASQUAROLI, S.; TOTA, S.; PARONCINI, P.; BIAVASCO, F. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant *Enterococci* in marine sediments. *PLoS One*, v.8, n.4, p.62838, 2013.

DI CESARE, A.; PASQUAROLI, S.; VIGNAROLI, C.; PARONCINI, P.; LUNA, G. M.; MANSO, E.; BIAVASCO, F. The marine environment as a reservoir of enterococci carrying resistance and virulence genes strongly associated with clinical strains. *Environ. Microbiol. Reports*, v.6, p.184–190, 2014.

DOMINGUES, C. M.; KOSAKA, P. M.; SOTILLO, A.; MIGORANCE, J.; TAMAYO, J.; CALLEJA, M. Label-Free DNA-Based Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampicin Resistance through Hydration Induced Stress in Microcantilevers. *Anal. Chem.*, v.87, p.1494-1498, 2015.

DUNNY, G. M.; HANCOCK, L. E.; SHANKAR, N. Enterococcal biofilm structure and role in colonization and disease. in: GILMORE, M. S.; CLEWELL D.B.; I. K. E. Y.; SHANKAR, N. (editors). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n.4, p.1628-1635, 2001.

ENNE, V. I.; DELSOL, A. A.; KOE, J. M.; BENNETT, P. M. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chem.*, v.53, p.203-207, 2004.

EUZÉBY, J. P. 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: 8 fev. 2016.

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.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. 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.

FDA – Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

FEPAM – FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER. Programa de Gerenciamento Costeiro (GERCO/RS). Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/programas/gerco.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

FERNANDES, M. S.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. T. Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. International J. Food Microbiol., v.200, p.97-103, 2015.

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

FRACALANZZA, S. A. P.; Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos. 2007. 158 f. Tese (Doutorado) – Inst. Nac. Contr. Qualid. Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

FRAZZON, A. P. G. ; GAMA, B. A.; HERMES, V.; BIERHALS, C. G.; PEREIRA, R. I.; GUEDES, A. G.; d'AZEVEDO, P. A.; 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.

FURUKAWA, T; YOSHIDA, T; SUZUKI, Y. Application of PFGE to source tracking of faecal pollution in coastal recreation area: a case study in Aoshima Beach, Japan. J. Appl. Microbiol., v.110, n.3, p.688-696, 2011.

FURUKAWA, T. and SUZUKI, Y. A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Microb. Environ., v.28, n.4, p.444-449, 2013.

GALLO, B. M. G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B. D.; BECHER, J. H.; BARATA, P. C. R. Sea turtle conservation in ubatuba, southeastern brazil, a feeding area with incidental capture in coastal fisheries. Chelonian Conserv. Biol., v.5, p.93–101, 2006.

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.

GAO, P.; OINKSTON, K. L.; NALLAPAREDDY, S. R.; HOOF, A.; MURRAY, B. E.; HARVEY, B. R. *Enterococcus faecalis* *rnjB* Is Required for Pilin Gene Expression and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.*, v.192, p.5489-5498, 2010.

GARCIA-FERNANDEZ, A. J.; GOMEZ-RAMIREZ, P.; MARTINEZ-LOPEZ, E.; HERNANDEZ-GARCIA, A.; MARIA-MOJICA, P.; ROMERO, D.; JIMÉNEZ, P.; CASTILLO, J. J.; BELLIDO, J. J. Heavy metals in 32 tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Southwestern mediterranean (Spain). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.72, p.557-563, 2009.

GARRIDO, A.M.; GÁLVEZ, A.; PULIDO, R.P. Antimicrobial resistancn *Enterococci*. *J. Infec. Dis. Therapy*, v.2, 2014.

GERACI, J. R. and LOUNSBURY, V. J. *Marine Mammals Ashore: a field guide for strandings*. 2nd. ed. Baltimore: National Aquarium in Baltimore, p. 177-188, 2005.

GILAD, J.; BORER, A.; RIESENBERG, K.; PELED, N.; SHNAIDER, A.; SCHLAEFFER, F. *Enterococcus hirae* septicemia in a patient with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.17, p.576-577, 1998.

GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.16, n.1, p.10-16, 2013.

GODLEY, B. J.; THOMPSON, D. R.; FURNESS, R. W. Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea? *Mar. Pollut. Bull.*, v.38, n.6, p.497-502, 1999.

GODLEY. B. J.; BRODEREICK, A. C.; HAYS, G. C. Nesting of green turtles (*Chelonia mydas*) at Ascension island, South Atlantic. *Biolog. Conserv.*, v.97, p.151-158, 2001.

GOLIŃSKA, E.; TOMUSIAK, A.; GOSIEWSKI, T.; WIĘCEK, G.; MACHUL, A.; MIKOŁAJCZYK, D.; BULANDA, M.; HECZKO, P. B.; 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.

GOODE-McCRINK, M. Pollution: A global threat. *Environ. Int.*, v.68, p.162–170, 2014.

GROSSMAN, A. Biologia reprodutiva de *Chelonia mydas* (Reptilia), na Reserva Biológica do Atol das Rocas. 2001. 43p. (Dissertação) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, 2001.

GROSSMAN, A.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. A. Reproductive biology of the green turtle at the biological. Reserve of Atol das Rocas off northeast Brazil. 2002. in: SEMINOFF J. A. (comp.). *Proceedings of the 22nd Annual Symposium on Sea Turtle biology and conservation*. NOAA. p.136, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

GUIRLET, E.; DAS, K.; GIRONDOT, M. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicol.*, v.88, p.267-276, 2008.

GULKO, D. and ECKERT, K. *Sea Turtles: An Ecological Guide*. Mutual Publishing, p.128, 2004.

HAMANN, M.; GODFREY, M. H.; SEMINOFF, J. A.; ARTHUR, K.; BARATA, P. C. R.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; BRODERICK, A. C.; CAMPBELL, L. M.; CARRERAS, C.; CASALE, P.; CHALOUPKA, M.; CHAN, S. K. F.; COYNE, M. S.; CROWDER, L. B.; DIEZ, C. E.; DUTTON, P. H.; EPPERLY, S. P.; FITZSIMMONS, N. N.; FORMIA, A.; GIRONDOT, M.; HAYS, G. C.; IJIUNN, C.; KASKA, Y.; LEWISON, R.; MORTIMER, J. A.; NICHOLS, W. J.; REINA, R. D.; SHANKER, K.; SPOTILA, J. R.; TOMÁS, J.; WALLACE, B. P.; WORK, T. M.; ZBINDEN, J.; GODLEY, B. J. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger. Species Res.*, v.11, p.245-269, 2010.

HANCOCK, L. E.; MURRAY, B. E.; SILLANPAA J. Enterococcal Cell Wall Components and Structures. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N. (editors). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

HAYS, G. C. Sea turtles: A review of some key recent discoveries and remaining questions. *J. Experi. Mar. Biol. Ecol.*, v.356, p.1-7, 2008.

HAYS, G. C. and SCOTT, R. Global patterns for upper ceilings on migration distance in sea turtles and comparisons with fish, birds and mammals. *Funct. Ecol.*, v.27, p.748–756, 2013.



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.

HIRAYAMA, R. Oldest known sea turtle. *Nature*, v.392, p.705-708, 1998.

HIRTH, H. F. Synopsis of the biological data on Green Turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). Fish and Wildlife Service, 1997.

HUTCHINSON, J.; SIMMONDS, M. A review of the effects of pollution on marine turtles: a Greenpeace ecotoxicology Project. Greenpeace, 1991.

HUTCHINSON, J.; SIMMONDS, M. Escalation of threats to marine turtles. *Oryx*. v.26, p.95-102, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default.shtm>>. Acesso em 20 jan 2016.

IKONOMOPOULOU, M. P.; OLSZOWY, H.; HODGE, M.; BRADLEY, A. J. The effect of organochlorines and heavy metals on sex steroid-binding proteins in vitro in the plasma of nesting green turtles, *Chelonia mydas*. *J. Comp. Physiol. B*. v.179, p.653-662, 2009.

ISEPPI, R.; MESSI, P.; ANACARSO, I.; BONDI, M.; SABIA, C.; CONDÒ, C.; NIEDERHAUSERN, N. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiol.*, v.38, p.369-378, 2015.

IUCN. Internacional Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. Disponível em <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 10 jan. 2016.

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

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.8, p.3558-3565, 2004.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; DAVIS, J. A.; BARRETT, J. B.; BROUSSE, J. H.; GUSTAFSON, J.; KUCHER, M. Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among *enterococci* isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.*, v.108, n.6, p.2171–2179, 2010.

- JENSEN, A. E.; CHEVILLE, N. F.; THOEN, C. O.; MACMILLAN, A. P.; MILLER, W. G. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Columbia, v.11, n.2, p.52-157, 1999.
- JETT, BD; HUYCKE, MM; GILMORE, MS. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiol. Rev.*, v.7, n.4, p.462-478, 1994.
- JOHANSSON, D. and RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. *Microbial. Pathog.*, v.55, p.28-31, 2013.
- JOYNER, P. H.; BROWN, J. D.; HOLLADAY, S.; SLEEMAN, J. M. Characterization of the Bacterial Microflora of the Tympanic Cavity of Eastern Box Turtles With and Without Aural Abscesses. *J. Wildlife Dis.*, v.42, p.859-864, 2006.
- JUNG, W. K.; LIM, J. Y.; KWON, N. H.; KIM, J. M.; HONG, S. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *International J. Food Microbiol.*, v.113, n.1, p.102-107, 2007.
- KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.11, p.3497-3503, 1999.
- KELLER, J. M.; MCCLELLAN-GREEN, P. D.; KUCKLICK, J. R.; KEIL, D. E.; PEDEN-ADAMS, M. M. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. *Environ. Health Perspec.*, v.114, p.70-76, 2006.
- KEM, E.; NUNES, S.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DER HEIDE, H. G. J.; SCOULS, L. M. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PLoS One*, v.6, 2011.
- KLIBI, N.; AMOR, I. B.; RAHMOUNI, M.; DZIRI, R.; DOUJA, G.; SAID, L. B.; LOZANO, C.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K. B.; MANSOURI, R.; TORRES, C. Diversity of species and antibiotic resistance among fecal enterococci from wild birds in Tunisia. Detection of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates. *Eur. J. Wildl. Res.*, 2014.
- KNIJFF, E.; DELLAGLIO, F.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; TORRIANI, S. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Meth.*, v.47, p.35-40, 2001.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, Amsterda, v.22, n.7, p.822-830, 2004.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, v.3, 2013.

KOTAS, J. E.; SANTOS, S.; AZEVEDO, V. G.; GALLO, B. M. G.; BARATA, P. C. R. Incidental capture of loggerhead (*Caretta caretta*) and leatherback (*Dermochelys coriacea*) sea turtles by the pelagic longline fishery off southern Brazil. *Fish. Bull.*, v.102, p.393–399, 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.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A Review – Part I. *Chemosphere*, v.75, n.4, p.417-434, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A Review – Part II. *Chemosphere*, v.75, n.4, p.435-441, 2009b.

LARA-RUIZ, P.; LOPEZ, G. G.; SANTOS, F. R.; SOARES, L. S. Extensive hybridization in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in brazil revealed by *mtDNA* analyses. *Conserv. Genetics*. Dordrecht, v.7, p.773-781, 2006.

LAYTON, B. A.; WALTERS, S. P.; LAM, L. H.; BOEHM, A. B. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, v.109, n.2, p.539-547, 2010.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. in: GILMORE M. S.; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N. (editors). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LEE, M. S. Y.; Palaeontology: turtles in transition. *Current Biology.*, v.23, n.12, pR513-R515, 2013.

LEE, P. L. M.; LUSCHI, P; HAYS, G. C. Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Mol. Ecol.*, v.16, p.61–74,

2007.

LEI N° 5.197, DE 3 DE JANEIRO DE 1967. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l5197.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l5197.htm)>. Acesso em 20 jan. 2016.

LEITCH, K. Entanglement of Marine Turtles in Netting: Northeast Arnhem Land, Northern Territory, Australia. Report to World Wide fund for nature Australia, and humane Society international, Dhimurru Land Management Aboriginal Corporation, Northern Territory, 2001.

LEWISON, R. L.; FREEMAN, S. A.; CROWDER, L. B. Quantifying the effects of fisheries on threatened species: the impact of pelagic longlines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecol. Lett.*, v.7, p.221–231, 2004.

LIMA, E. H. S. M.; MELO, M. T. D.; BARATA, P. C. R. Incidental capture of sea turtles by the lobster fishery off the Ceará coast, Brazil. *Mar. Turt. Newsl.*, v.128, p.16-19, 2011

LIMPUS, C. J. The green turtle, *Chelonia mydas*, in Queensland : breeding males in the southern Great barrier. *Reef Wildlife Res.*, v.20, p.513-523, 1993.

LIU, C.; ZHANG, Z-Y.; DONG, K.; YUAN, J-P.; GUOP, X-K. Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Biomed. Environ. Sci.*, v.22, p.401-412, 2009.

LOHMANN, K. J. and LOHMANN, C. M. F. Sea turtles, lobsters, and oceanic magnetic maps. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.*, v.39, p.49–64, 2006.

LOHMANN, K. J.; WITHERINGTON, B. E.; LOHMANN, C. M. F.; SALMON, M. Orientation, navigation, and natal beach homing in sea turtles. in: LUTZ, P.L. AND MUSICK, J.A. (eds.). *The biology of Sea Turtles*. CRC Press. p.107–135, 1997.

LOHMANN, K. J.; LOHMANN, C. M. F.; ENDRES, C. S. The sensory ecology of ocean navigation. *J. Exper. Biol.*, v.211, p.1719-1728. 2008.

LOHMANN, K. J.; PUTMAN, N. F.; LOHMANN, C. M. F. The magnetic map of hatchling loggerhead sea turtles. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.22, p.336–342, 2012.

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

LUTCAVAGE, M. E., PLOTKIN, P., WITHERINGTON, B.; LUTZ, P. I. Human impacts on sea turtle survival. in: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press., p.387-409, 1997.

LUTZ, P. L. and MUSICK, J. A. (ed.). The biology of sea turtles. Boca Raton: CRC Press. 432 p., 1997.

LYSON, TR; BEVER, GS; SCHEYER, TM; HSIANG, AY; GAUTHIER, JA. Evolutionary Origin of the turtle shell. *Curr. Biol.*, v.23, p.1113-1119, 2013.

MACHADO, A. B. M. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Editores Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. - 1.ed. - Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2v. (1420 p.): il. – (Biodiversidade; 19) 2008.

MACHADO, A. S. D.; PAPA, P. C. (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.

MÄDER, A. Efeitos da antropização da Zona Costeira sobre assembleias se aves. Dissertação (Mestrado em Diversidade e Manejo de Vida Silvestre.). 2010. 75f. – Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo, 2010.

MAFFUCCI, F.; CAURANT, F.; BUSTAMANTE, P.; BENTIVEGNA, F. Trace element (cd, cu, hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere*, v.58, p.535-542, 2005.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Ver. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MANERO, A. and BLANCH, A. R. 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, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.*, v.88, n.2-3, p.291-304, 2003.

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.

MARINHO, C.; SILVA, N.; POMBO, S.; SANTOS, T.; MONTEIRO, R.; GONÇALVES, A.; MICAEL, J.; RODRIGUES, P.; COSTA, A. C.; IGREJAS, G.;

POETA, P. Echinoderms from Azores islands: an unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. Mar. Pollut. Bull., v.69, n.1-2, p.122-127, 2013.

MARTINS-LEITE, L.; MAHU, M. I.; COSTA, A. L.; BESSA, L. J.; VAZ-PIRES, P.; LOUREIRO, L.; NIZA-RIBEIRO, J.; MATOS, A. J. F.; COSTA, P. M. Prevalence of antimicrobial resistance in faecal enterococci from vet-visiting pets and assessment of risk factors, Veterinary Record, v.176, 2015.

MARCOVALDI, M. A.; GODFREY, M. H.; MROSOVSKY, N. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. Canadian J. Zoology, n.75, p.755-770, 1997.

MARCOVALDI, M. Â.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S. e; BELINI, C.; SANTOS, A. S. dos; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Rev. Biodiversid. Bras., n.1, p.20-27, 2011.

MARCOVALDI, M. A.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R. Fifteen years of hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in northern Brazil. Chelonian Conserv. Biol., v.6, n.2, p.223-228, 2007.

MARCOVALDI, M. A.; VIEITAS, C. F.; GODFREY, M. H. Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. Chelonian Conserv. Biol., v.3, n.2, p.301-307, 1999.

MÁRQUEZ, M. R. FAO species catalogue. Vol.11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO fisheries Synopsis n. 125, v. 11. Rome, FAO. 81 p. 1990.

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

MASCARENHAS, R.; SANTOS, R. G.; SANTOS, A. S.; ZEPPELINI, D. Nesting of hawksbill turtles in Paraíba-Brazil: avoiding light pollution effects. Mar. Turt. Newsl., n.104, p.1-3, 2004.

MASCARENHAS, R.; ZEPPELINI FILHO, D.; MOREIRA, V. S. Observations on sea turtles in the State of Paraíba, Brazil. Mar. Turt. Newsl., v.101, p.16-18, 2003.

MASUNARI, A. and TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a

Staphylococcus aureus multiresistente (MRSA). Rev. Bras. Ciênc. Farmac., v.42, n.2, 2006.

MCCAULEY, R. D.; J. FEWTRELL; A. J. DUNCAN; C. JENNER; M. JENNER; J. D. PENROSE; R. I. T. PRINCE; A. ADHITYA; MURDOCH, J. and MCCABE, K. Marine Sismic Surveys: Analysis and Propagation of Air-gun Signals; and Effects of Air-guns Exposure on Humpback Whales, Sea Turtles, Fishes and Squid. Report for Australian Petroleum Production Exploration Association Prepared by Centre for Marine Science and Technology, 198p., 2000.

MEDEIROS, A. W. 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*. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MEDEIROS, A. W.; PEREIRA, R. I.; OLIVEIRA, D. V.; MARTINS, P. D.; d'AZEVEDO, P. A.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. F. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz. J. Microbiol., v.45, n.1, 2013.

MEYLAN, A. B. and DONNELLY, M. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 iucn Red list of Threatened Animals. Chelonian Conserv. Biol., v.3, n.2, p.200-224, 1999.

MILLER, J. D. Reproduction in sea turtles. in: LUTZ, P. L. AND MUSICK, J. A. (eds.). The biology of Sea Turtles. CRC Press., p.51–81, 1997.

MOHAMED, J. A. and HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. J. Med. Microbiol., v.56, n.12, p.1581-1588, 2007.

MOHAMED, J. A. and MURRAY, B. E. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. J. Clin. Microbiol., v.43, n.10, p.5405-5407, 2005.

MONAGAS. ; OROS, J.; ARANA, J.; GONZÁLEZ-DIAZ, O.M. Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the canary islands, Spain. Mar. Pollut. Bull., v.56, n.11, p.1949-1952, 2008.

MONTEIRO, D. S. Encalhes e interação de tartarugas marinhas com a pesca no litoral do Rio Grande do Sul. 2004. 63f. monografia (Graduação em biologia) – fundação universidade federal do Rio Grande, 2004.

MOURA, J. F.; CARDOSO, M.; BELO, M. S. S.; HACON, S; SICILIANO, S. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças,

impactos socioeconômicos e relações benéficas. Ciências e Saúde Coletiva, 16(8), p.3469-3480, 2011.

MOREIRA, L. M. P. Ecologia reprodutiva e estimativa de ninhos da tartaruga verde-aruanã – *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, reptilia) na ilha da Trindade – Espírito Santo – Brasil. 2003. 63f. Dissertação (mestrado em biologia Animal) – Programa de Pós-graduação em ciências biológicas, universidade federal do Espírito Santo, ES, 2003.

MOREIRA, L. M. P.; BAPTISTOTTE, C.; SCALFONI, J.; THOMÉ, J. C.; ALMEIDA, A. P. L. S. Occurrence of *Chelonia mydas* on the island of Trindade, Brazil. Mar. Turt. Newsl., n.70, p.2, 1995.

MORTIMER, J. A. The state of the world's hawksbills. SWOT Report. v.3, p.10-13, 2007.

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, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

MROSOVSKY, N. Sex ratios of sea turtles. J. Experim. Zoology. v.270, p.16-27, 1994.

MROSOVSKY, N.; RYAN, G. D.; JAMES, M. C. Leatherback turtles: The menace of plastic. Mar. Pollut. Bull., v.58, p.287-289, 2009.

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci on plants in a wild environment. J. Appl. Microbiol., v.11, n.2, p.141-144, 1963.

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci: Bud., Blossom., and soil studies. J. Appl. Microbiol., v.9, n.6, p.541-544, 1961.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev., v.13, n.4, p.513-522, 2000.

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

MUSICK, J. A. and LIMPUS, C. J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. in: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (eds.). The biology of sea turtles. Boca Raton: CRC Press., p.137-164, 1997.

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.

NOAA. Oil and Sea Turtles biology, Planning and Response. in: <http://response.restoration.noaa.gov/oilands/turtles/pdfs/chapter4.pdf>, 2003.

NORDMANN, P. and POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimic. Chemoth.*, v.56, p.463-469, 2005.

NOWAKIEWICZ, A.; ZIÓŁKOWSKA, G.; ZIĘBA P.; DZIEDZIC, B. M.; GNAT, S.; WÓJCIK, M.; DZIEDZIC, R.; KOSTRUBA, A. Aerobic Bacterial Microbiota Isolated from the Cloaca of the European Pond Turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. *J. Wildlife Dis.*, v.51, p.255-259, 2015.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.54, p.49-79, 2000.

ORAVCOVA, V; ZUREK, L; OWNSSEND, A; CLARK, AB; ELLIS, JC; CIZEK, A; LITERAK, I. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene. *Environ. Microbiol.*, v.16, n.4, p.939-949, 2014.

PASQUAROLI, S.; DI CESARE, A.; VIGNAROLI, C.; CONTI, G.; CITTERIO, B.; BIAVASCO, F. Erythromycin- and copper-resistant *Enterococcus hirae* from marine sediment and co-transfer of *erm(B)* and *tcrB* to human *Enterococcus faecalis*. *Diagnostic Microbiol. Infec. Dis.*, v.80, p.26 –28, 2014.

PEDROSA, L. W. and VERISSIMO, I. Redução das Capturas Incidentais de Tartarugas Marinhas no Banco dos Abrolhos. Relatório final de Atividades – Parceria cbc/ci-brasil –fY04. 233 p., 2006.

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. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.749-755, 2008.

PINEDO, M. C., R. CAPITOLI, A. S. BARRETO, A. L. V. ANDRADE. Occurrence and feeding of sea turtles in southern Brazil. in: BYLES, R. and FERNANDEZ, Y. Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle conservation and biology NOAA Tech. Memor. 412, p. 117–118, 1998.

PINTO, T. C. A.; SOUZA, A. R. V.; PINA, S. E. C. M.; COSTA, N. S.; NETO, A. A. B.; NEVES, F. P. G.; MERQUIOR, V. L. C.; DIAS, C. A. G.; PERALTA, J. M.; TEIXEIRA, LM. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel

mutations in the *atpC* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington DC, v. 51, n. 10, p. 3242-3249, Oct. 2013.

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, n.9, p.396-402, 2005.

POLOCZANSKA, E. S.; LIMPUS, C. J.; HAYS, G. C. Vulnerability of marine turtles to climate change. *Adv. Mar. Biol.*, v.56, p.151-211, 2009.

PORTILLO, A. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v.44, p.967-971, 2000.

PRICHULA, J. Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. 2015. 154f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

PRICHULA, J; CAMPOS, FS; PEREIRA, RI; CARDOSO, LA; WACHHOLZ, GR; PIETA, L; MARIOT, RF; MOURA, TM; TAVARES, M; d'AZEVEDO, PA; FRAZZON, J; FRAZZON, APG. Complete Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* Strain P8-1 Isolated from Wild Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*) Feces on the South Coast of Brazil, v.4, 2016.

PRITCHARD, P. C. H. and MORTIMER, J. A. Taxonomy, external morphology and species identification. in: ECKERT, K. L.; BORNDAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. A.; DONNELLY, M. *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. Marine Turtle Specialist Group Publication, v.4, p.21-38, 1999.

PRITCHARD, P. C. H. Evolution, phylogeny, and current status. in: LUTZ, P. L. and MUSICK, J. A. (eds.). *The biology of Sea Turtles*. CRC Press. p.1–28, 1997.

PRITCHARD, P. C. H. Post-nesting movements of marine turtles (Cheloniidae and Dermochelyidae) tagged in the Guianas. *Copeia.*, v.1976, p.749-754, 1976.

QIN, X.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B.E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Imm.*, v.68, n.5, p.2579-2586, 2000.

RAMSEY, M.; HARTKE, A.; HUYCKE, M. The physiology and metabolism of *Enterococci*. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL D. B.; IKE Y; SHANKAR, N.

(editors). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

REIS E. C.; SILVEIRA, V. V. B.; SICILIANO, S. Records of stranded sea turtles on the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. Mar. Biodiver. Records., v.2, p.121, 2009a.

REIS, E. C.; SOARES, L. S.; VARGAS, S. M.; SANTOS, F. R.; YOUNG, R. J.; BJORN DAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; LÔBO-HADJU, G. Genetic composition, population structure and phylogeography of loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. Conserv. Genetics. 2009b.

REISSER, J.; PROIETTI, M.; KINAS, P.; SAZIMA, I. Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. Endanger. Species Res., v.5, p.73–82, 2008.

RESOLUÇÃO Nº 274, DE 29 DE NOVEMBRO DE 2000. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>. Acesso em: 20 jan. 2016.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; d' AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial resistant profile of *Enterococcus* sp. isolated from food in southern Brazil. Bras. J. Microbiol., v.40, p.125-128, 2009.

RIGON C. T. Análise da ingestão de resíduos sólidos e impacto no trato gastrointestinal em juvenis de *Chelonia mydas* (Linneus, 1758) no litoral norte e médio leste do Rio Grande do Sul, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha. Imbé/Osório, Rio Grande do Sul, 2012.

SAEEDI, B.; HALLGREN, A.; JONASSON, J.; NILSSON, L. E.; HANBERGER, H.; ISAKSSON, B. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. APMIS, Copenhagen, v.110, n.12, p.869-874, 2002.

SAID, L. B.; KLIBI, N.; LOZANO, C.; DZIRIA, R.; SLAMA, K. B.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Diversity of enterococcal species and characterization of high-level aminoglycoside resistant enterococci of samples of wastewater and surface water in Tunisia. Sci. Total Environ., v.530–531, p.11–17, 2015.

SADOWY, E. and LUCZKIEWICZ, A. Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. BMC Microbiol., v.14, p.1-15, 2014.

SANCHES, T. M.; BELLINI, C. Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. Chelonian Conserv. Biol., v.3, n.2, p.308-31, 1999.

SANDOE, J. A. ; WITHERDEN, I. R.; COVE, J. H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M. H. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J. Med. Microbiol.*, v.52, n.7, p.547-550, 2003.

SANTESTEVAN, NA; ZVOBODA, DA; PRICHULA, J; PEREIRA, RI; WACHHOLZ, GR; CARDOSO, LA; MOURA, TM; MEDEIROS, AW; AMORIN, DB; TAVARES, M; d'AZEVEDO, PA; FRANCO, AC; FRAZZON, J; FRAZZON, APG. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal) *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.31, p.1935–1946, 2015.

SCHWAIGER, K.; HELMKE, K.; HÖLZEL, C.S.; BAUER, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int. J. Food Microbiol.*, v.148, p.191-196, 2011.

SEILER, C., AND BERENDONK, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.*, v.3, 2012.

SEMEDO, T; SANTOS, MA; MARTINS, P; LOPES, MFS; MARQUES, JJF; 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*. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, 2003.

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

SHANKAR, N.; COBURN, P.; PILLAR, C.; HAAS, W.; GILMORE, M. S. Enterococcal cytolysin; activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *J. Med. Microbiol.*, v.293, p.609-618, 2004.

SHEPARD, B. D. and GILMORE, M. S. Antimicrobial-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.*, v.4, p.215-224, 2002a.

SHEPARD, B. D. and GILMORE, M. S. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. *Infect. Immun.*, v.70, n.8, p.4344-4352, 2002b.

SHIGENAKA, G. *Oil and Sea Turtles: biology, planning and response*. [S.I.]: national oceanic and Atmospheric Administration. 110 p., 2003.

SILVA, L. M. Captura incidental de tartarugas marinhas no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente – RS – Brasil. Pelotas: universidade católica de Pelotas, 2006. 23f. Monografia (Graduação em Ecologia) – Escola de ciências Ambientais, universidade católica de Pelotas, 2006.

SINGH, K. V.; COQUE, T. M.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. FEMS Immunol. Med. Microbiol., v.21, p.323-331, 1998.

SPENCE, R. Distribution and taxonomy of enterococci from the Davis Station wastewater discharge, Antarctica. 2014. (Research – Master of Applied Science) – School of Earth, Environmental and Biological Sciences. Science and Engineering Faculty, Queensland University of Technology, 2014.

SOTO, J. M. R.; BEHEREGARAY, R. C. P. New records of *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) and *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) in the Southwest Atlantic. Mar. Turt. Newsl., n.77, p.8-10, 1997.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J. Microbiol. Methods, v.40, n.2, p.175-179, 2000.

STEWART, J. R.; TOWNSEND, F. I.; LANE, S. M.; DYAR, E.; HOHN, A. A.; ROWLES, T. K.; STAGGS, L. A.; WELLS, R. S.; BALMER, B. C.; SCHWACKE, L. H. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. Dis. Aquat. Org., v.108, n.2, p.91-102, 2014.

STODDARD, R. A.; DELONG, R. L.; BYRNE, B. A.; JANG, S.; GULLAND, F. M. D. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. among marine animals in the Channel Islands, California. Dis. Aquat. Org., v.81, n.1, p.5-11, 2008.

SUBMUTH, S. D. ; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSA, M.; MARRE, R.; ROZDZINSKI, E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. Infect. Immun, v.68, n.9, p. 4900-4906, 2000.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (S.I.), v.40, n.11, p.2562-2566, 1996.

TAMAR. Projeto TAMAR. Disponível em: <http://www.tamar.org.br/interna.php?cod=109>. Acesso em 21 jan. 2016.

TALARMIN, J. P.; PINEAU, S.; GUILLOUZOUIC, A.; BOUTOILLE, D.; GIRAUDEAU, C.; REYNAUD, A. Relapse of *Enterococcus hirae* prosthetic valve endocarditis. J. Clin. Microbiol., v.49, p.1182–1184, 2011.

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 L. M.; MERQUIOR, V. L. C. *Enterococcus*. In: FILIPPIS, I.; MCKEE, L.M. (editors). Molecular typing in bacterial infections. New York: Humana Press, p.17-26, 2013.

TEIXEIRA L. M.; CARVALHO, M. G.; SHEWMAKER, P. L.; FACKLAM, R.R. *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.

TEJEDOR-JUNCO, M. T.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; GONZÁLEZ, N. F. R.; GUTIÉRRE, C. Identification, antimicrobial susceptibility, and virulence factors of *Enterococcus* spp. strains isolated from Camels in Canary Islands, Spain. Vet. Ital., v.51, p.179-183, 2015.

TENOVER, F. C. ; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., v.33, p.2233-2239, 1995.

THOMÉ, J.; MARCOVALDI, M. A.; MARCOVALDI, G; BELLINI, C; GALLO, B; LIMA, E; SILVA, A. C; BARATA, P. C. An overview of Projeto Tamar Ibama's activities in relation to the incidental capture in sea turtles in Brazilian fisheries. Proceedings of the Twenty-Second Annual Symposium on Sea Turtle biology and conservation. Miami, fl, USA. NOAA Technical Memorandum nrmS - SEFSC – 503, p.119-120, 2003.

TOMÁS, J.; GUITART, R.; MATEO, R.; RAGA, J. A. Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta* from the Western Mediterranean. Mar. Pollut. Bull., v.44, n.3, p.211-216, 2002.

TRÖENG, S.; RANKIN, E. Long-term conservation efforts contribute to positive green turtle *Chelonia mydas* nesting trend at Tortuguero, Costa Rica. Biological Conserv., v.121, p.111–116, 2005.

TSIKRIKONIS, G. ; MANIATIS, A. N.; LABROU, M.; NTOKOU, E.; MICHAIL, G.; DAPONTE, A.; STATHOPOULOS, C.; TSAKRIS, A.; POURNARAS, S. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathog.*, v.52, p.336-343, 2012.

TUPIN, A.; GUALTIERI, M.; BANÈRES-ROQUET, F.; MORICHAUD, Z.; BRODOLIN, K.; LEONETTI, J-P. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.35, p.519-523, 2010.

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

TURRA, A; DENADAI, MR. Protocolos para o monitoramento de habitats bentônicos costeiros. Rede de Monitoramento de Habitat Bentônicos Costeiros, ReBentos [online]. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 258 p. ISBN 978-85-98729-25-1. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>, 2015.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M. M.; TOPISIROVIC, M. K. L. T.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, v.20, p.381–385, 2009.

VELJOVIĆ, K.; POPOVIĆ, N.; VIDOJEVIĆ, A. T.; TOLINAČKI, M.; MIHAJLOVIĆ, S.; JOVČIĆ, B.; KOJIĆ, M. Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environ. Monit. Assess.*, p.187, 2015.

VEGA-MUNGUÍA, A; ARROYO-SÁENZ, A; GREENLEY, AP; MONTES-ESPINOSA, JA; PALUMBI, SR; ROSSETO, M; MICHELI, F. Marine reserves help preserve genetic diversity after impacts derived from climate variability: Lessons from the pink abalone in Baja California. *Glob. Ecol. Conserv.*, v.4, p.264-276, 2015.

VILAÇA, S.T.; SANTOS, F.R. Sea Turtle Population in Brazil. Hindawi Publishing Corporation, Article ID 196492, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/196492>, 2013.

WALLACE, B. P.; DIMATTEO, A. D.; HURLEY, B. J.; FINKBEINER, E. M.; BOLTON, A. B.; CHALOUPEK, M. Y.; HUTCHINSON, B. J.; ABREU-GROBOIS, F. A.; AMOROCHO, D.; BJORNDALE, K. A.; BOURJEA, J.; BOWEN, B. W.; BRISEÑO DUEÑAS, R.; CASALE, P.; CHOUDHURY, B. C.; COSTA, A.; DUTTON, P. H.; FALLABRINO, A.; GIRARD, A.; GIRONDOT, M.; GODFREY, M. H.; HAMANN, M.; LÓPEZMENDILAHARSU, M.; MARCOVALDI, M. A.; MORTIMER, J. A.; MUSICK, J. A.; NEL, R.; PILCHER, N. J.; SEMINOFF, J. A.;

TROËNG, S.; WITHERINGTON B.; MAST, R. B. Regional management units for marine turtles: A novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *Plos one*, v.5 (12), 2011.

WALLACE, B. P.; LEWINSON, R. L.; MCDONALD, R. K.; KOT, C. Y.; KELEZ, S.; BJORKLAND, R. K.; FINKBEINER, E. M.; HELMBRECHT, S.; CROWDER, L. B. Global patterns of marine turtle bycatch. *Conserv. Letters*, v.3, n.3, p.131-142, 2010.

WEBER, S. B.; BLOUNT, J. D.; GODLEY, B. J.; WITT, M. J.; BRODERICK, A. C. Rate of egg maturation in marine turtle sex hibits 'universal temperature dependence'. *J. Animal Ecol.*, v.80, p.1034–1041, 2011.

WERNER, G; HILDEBRANDT, B; WITTE, W. The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, v.45, n.12, p.3672-3673, 2001.

WERNER, G.; FLEIGE, C.; NEUMANN, B.; BENDER, J. K.; LAYER, F.; KLARE, I. Evaluation of DiversiLab®, MLST and PFGE typing for discriminating clinical *Enterococcus faecium* isolates. *J. Microbiol. Methods*, v.118, p.81–84, 2015.

WIJETUNGE, D. S.; DUNN, P.; WALLNER-PENDLETON, E.; LINTNER, V.; LU, H.; KARIYAWASAM, S. Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *J. Veter. Diagnost. Investig.*, v.24, n.6, p.1166-1171, 2012.

WITHERINGTON, B. E. and MARTIN, R. E. understanding, assessing, and resolving light-pollution problems on sea turtle nesting beaches. Florida Marine Research Institute Technical Report. 73 p., 1996.

WOOLGAR, L; TROCINI, S; MITCHEL, N. Key parameters describing temperature-dependent sex determination in the Southern most population of logger head sea turtles. *J. Experim. Mar. Biol. Ecol.*, v.449, p.77–84, 2013.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews*, v.5, n.3, p.175-186, 2007.

WWF - Brasil. "World Wildlife Fund" Brasil. Disponível em [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/questoes\\_ambientais/biomas/bioma\\_costeiro/biomas\\_costeira\\_curiosidades/](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_costeiro/biomas_costeira_curiosidades/). Acesso em: 20 jan. 2016.

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



ZOU, L-K.; WANG, H-N.; ZENG, B.; LI, J-N.; LI, X-T.; ZHANG, A-Y.; ZHOU, Y-S.; YANG, X.; XU, C-W.; XIA, Q-Q. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiologica*, v.34, p.73-80, 2011.

## 8 APÊNDICES

### APÊNDICE A – 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 assépticas, 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 às instalações apropriadas, em refrigerador ou freezer, sendo encaminhadas ao laboratório o mais rapidamente 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 com suabe retal/cloacal de animais vivos ou de conteúdo intestinal de animais mortos (preferencialmente até Code 2).

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