

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

***Enterococcus* sp. ISOLADOS DE FEZES DE MACACO-PREGO  
(*Sapajus nigritus*) (GOLDFUSS, 1809) COLETADAS EM REMANESCENTES DE  
MATA ATLÂNTICA E CATIVEIRO, NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL,  
BRASIL**

TIELA TRAPP GRASSOTTI

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

Porto Alegre

Julho/2018



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

***Enterococcus* sp. ISOLADOS DE FEZES DE MACACO-PREGO  
(*Sapajus nigritus*) (GOLDFUSS, 1809) COLETADAS EM REMANESCENTES DE  
MATA ATLÂNTICA E CATIVEIRO, NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL,  
BRASIL**

Tiela Trapp Grassotti  
Bacharela em Ciências Biológicas

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 do  
Ambiente

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Julho/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Grassotti, Tiela Trapp

Enterococcus sp. isolados de fezes de macaco-prego (*Sapajus nigritus*) (Goldfuss, 1809) coletadas em remanescentes de Mata Atlântica e cativeiro, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil / Tiela Trapp Grassotti. -- 2018.

91 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Enterococcus. 2. primatas. 3. resistência antimicrobiana. 4. virulência. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“The future of humanity and microbes likely will unfold as episodes of a suspense thriller that could be titled *Our Wits Versus Their Gene*”.

Joshua Lederberg

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom resultado sem o precioso apoio de algumas pessoas.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha orientadora professora Ana Paula Guedes Frazzon, pelo acolhimento desde o primeiro dia que a conheci. Pela paciência, ensinamentos e principalmente por me fazer enxergar minha capacidade e sempre me motivar.

Desejo igualmente agradecer a todos meus colegas de mestrado do laboratório 222C. Todos foram muito importantes e colaboraram com a conclusão deste trabalho. Em especial a Dejoara de Angelis Zvoboda pelas imensas ajudas com as amostras, pelas risadas e pela força que me passaste. Confio em você de olhos fechados! Gostaria de agradecer a minhas parceiras Letícia Fontoura Xavier Costa e Priscila Jankoski, que me ajudaram nos momentos mais difíceis da dissertação, com uma palavra, uma referência, um mapa! Letícia, com seu jeito protetor, foi um pedestal para que eu conseguisse chegar até o final desta jornada. Apoiou-me desde os tempos de IPV, e ainda mais ao ingressar no mestrado. Priscila, meiga de alma forte. Uma das poucas pessoas que consegue o perfeito equilíbrio entre paciência, esforço e sonho. O abraço mais espiritual que recebi! Vejo-me muito em você, quando queres fazer a diferença. Dedido este trabalho também a vocês, minhas queridas amigas cientistas!

Agradeço a meus pais, João Helio Grassotti e principalmente a minha mãe Margarete Trapp Grassotti pelo apoio, incentivo, investimento e confiança. É a pessoa em que eu mais me espelhei ao escolher minha profissão; a pessoa com que mais me deu força para vencer na vida; a pessoa que me mostrou as virtudes e valores que hoje tenho e pratico pela natureza; que me mostrou que devemos amar os animais desde a mais tenra idade; que devo acreditar na minha capacidade; que sonhar faz bem, que nasceu para ser e é Bióloga: Mãe, muito obrigado!

Ao meu namorado Tiago Oschelski, pelo apoio, incentivo, inúmeras ajudas matemáticas e estatísticas. Que não me deixou desistir quando tudo parecia perdido. Que sempre me deu amor, atenção e carinho, mesmo nos momentos de stress do mestrado. Minhas conquistas foram todas ao seu lado, meu amuleto da

sorte!

Agradeço aos meus queridos tios do Tocantins, Edgar Henrique Hein Trapp e Erivan Elias Silva de Almeida e minha vó Ottilda Hein Trapp, pela companhia, apoio e incentivo.

Agradeço a meus queridos bichinhos que sempre estiveram ao meu lado animando e acompanhando os momentos difíceis, que estão presentes ou que já viraram anjos. Vocês foram e sempre serão muito importantes na minha vida. Agradeço aos presentes Xaxá, Darwin, Veludo, Pandora, Rodaika e Shelly. Queridos, obrigado por tudo!

***Enterococcus* sp. ISOLADOS DE FEZES DE MACACO-PREGO  
(*Sapajus nigritus*) (GOLDFUSS, 1809) COLETADAS EM REMANESCENTES DE  
MATA ATLÂNTICA E CATIVEIRO, NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL,  
BRASIL<sup>1</sup>**

Autor: Tiela Trapp Grassotti

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

**RESUMO**

*Enterococcus* são associados à microbiota intestinal de mamíferos e aves. Além dos primatas apresentarem estreita relação evolutiva com seres humanos, é pouco conhecido o impacto da resistência antimicrobiana associada às bactérias comensais, como os enterococos. O trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar enterococos isolados de amostras fecais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) em relação a determinantes de resistência e virulência. As amostras foram coletadas de animais vivendo em cativeiro no Zoológico de Sapucaia do Sul (ZOO) e selvagens, nas cidades de São Sebastião do Caí (SSC) e Santa Cruz do Sul (SCS). As espécies isoladas foram identificadas utilizando a técnica de MALDI-TOF. Estas foram testadas frente a 12 antimicrobianos através do método disco difusão. Genes que conferem resistência à tetraciclina (*tetM*, *tetL* e *tetS*), fluoroquinolonas (*gyrA*), eritromicina (*msrC* e *ermB*) e virulência (*agg*, *esp*, *cylA*, *ace* e *geE*) foram detectados por PCR. Foram identificados 296 isolados de *Enterococcus* sp. oriundos de 24 amostras fecais de macacos-prego. Destes, 137 eram oriundos de amostras de SSC, 86 de SCS e 73 do ZOO. A espécie mais encontrada foi *E. faecalis* (42,6 %), seguida de *E. hirae* (29,4 %) e *E. faecium* (15,5 %). Cento e noventa e nove amostras (67,2 %) apresentaram suscetibilidade reduzida a antimicrobianos. As amostras apresentaram menos suscetíveis para rifampicina (46,3 %), tetraciclina (26,0 %) e eritromicina (22,3 %). Entre os isolados, *E. faecalis* (69,0 %) apresentou as maiores frequências de suscetibilidade reduzida. Em relação ao local de coleta, 69,3 % dos isolados das amostras SSC apresentaram suscetibilidade reduzida a antimicrobianos, 69,7 % dos isolados das amostras SCS e 60,2 % dos isolados das amostras do ZOO, sendo atribuído perfil de múltipla resistência a 29 isolados de SSC, 6 isolados SCS e 8 de ZOO. As amostras ZOO apresentaram maiores índices para os genes de resistência *msrC* (81,8 %), *gyrA* (60,7 %) e *tetL* (44,4 %). Para o gene *tetM* os isolados de SCS apresentaram maior frequência (100 %). As amostras SSC e SCS apresentaram as maiores porcentagens para o gene *geE* (100 %). Para *esp* (3,5 %), *ace* (93,0 %) e *agg* (10,5 %), as amostras SCS apresentaram as maiores porcentagens. As presenças de determinantes de resistência e virulência nas amostras foram atribuídas tanto à ação antropogênica encontrada no habitat dos macacos como através do próprio resistoma ambiental. Ainda, a proximidade dos animais com o ser humano demonstrou ser uma das principais fontes de disseminação de resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Enterococcus*; primatas; resistência antimicrobiana; virulência

<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. (91 p.) Julho, 2018.



***Enterococcus* sp. ISOLATES OF FEZES OF BLACK MONKEY  
CAPUCHIN (*Sapajus nigritus*) (GOLDFUSS, 1809) COLLECTED IN  
REMANESCENTS OF ATLANTIC FOREST AND CAPTIVITY, IN THE STATE OF  
RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL<sup>1</sup>**

Author: Tiela Trapp Grassotti

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

**ABSTRACT**

*Enterococcus* is associated with the intestinal microbiota of mammals and birds. In addition to primates having a close evolutionary relationship with humans, the impact of antimicrobial resistance associated with commensal bacteria, such as enterococci, is little known. The objective of this work was to identify and characterize isolates of enterococci from faecal samples of black capuchin monkey (*Sapajus nigritus*) in relation to determinants of resistance and virulence. The samples were collected from animals living in the Sapucaia do Sul Zoo (ZOO) and wild, in the cities São Sebastião do Caí (SSC) and Santa Cruz do Sul (SCS). The isolated species were identified using the MALDI-TOF technique. These were tested against 12 antimicrobials using the disc diffusion method. Genes that confer resistance to tetracycline (*tetM*, *tetL* and *tetS*), fluoroquinolones (*gyrA*), erythromycin (*mrsC* and *ermB*) and virulence (*agg*, *esp*, *cylA*, *ace* and *gelE*) were detected by PCR. It were identified 296 isolates of *Enterococcus* sp. from 24 faecal samples of *S. nigritus*. Of these, 137 were from SSC samples, 86 from SCS and 73 from ZOO. The most common species was *E. faecalis* (42.6 %), followed by *E. hirae* (29.4 %) and *E. faecium* (15.5 %). One hundred and ninety-nine samples (67.2%) presented reduced antimicrobial susceptibility. The samples were less susceptible to rifampicin (46.3%), tetracycline (26.0%) and erythromycin (22.0%). Among the isolates, *E. faecalis* (69.0%) had the highest frequencies of reduced susceptibility. Regarding the collection site, 69.3% of the SSC isolates presented reduced susceptibility to antimicrobials, 69.7% of the isolates from the SCS samples and 60.2% from the isolates from the ZOO samples, with a multiple resistance profile 29 SSC isolates, 6 SCS isolates and 8 ZOO isolates. The ZOO samples presented higher indices for the resistance genes *msrC* (81.8%), *gyrA* (60.7%) and *tetL* (44.4%). For the *tetM* gene the SCS isolates showed a higher frequency (100%). The SSC and SCS samples showed the highest percentages for the *gelE* gene (100%). For *esp* (3.5%), *ace* (93.0%) and *agg* (10.5%), the SCS samples presented the highest percentages. The presences of resistance and virulence determinants in the samples were attributed both to the anthropogenic action found in the monkey habitat and through the environmental resistance itself. Furthermore, the proximity of animals to humans has been shown to be one of the main sources of dissemination of bacterial resistance.

Key-words: *Enterococcus*; primates; antimicrobial resistance; virulence

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (91 p.) July, 2018.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
2.1 Objetivo Geral .....	2
2.2 Objetivos Específicos .....	2
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
3.1 Fragmentação Florestal.....	3
3.2 A espécie <i>Sapajus nigritus</i> .....	4
3.3 Gênero <i>Enterococcus</i> .....	6
3.4 Resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i> sp. ....	7
3.4.1 Resistência aos macrolídeos (eritromicina ( <i>msrC ermB</i> )).....	8
3.4.2 Resistência às ansamicinas (rifampicina).....	10
3.4.3 Resistência às tetraciclinas ( <i>tetM, tetL, tetS</i> ).....	11
3.4.4 Resistência à fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina – <i>gyrA</i> )....	12
3.4.5 Resistência aos glicopeptídeos (vancomicina).....	13
3.4.6 Resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina).....	14
3.4.7 Resistência ao fenicol (cloranfenicol) .....	15
3.4.8 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos (ampicilina).....	16
3.4.9 Resistência aos nitrofuranos (nitrofurantoína).....	17
3.4.10 Resistência às oxazolidinonas (linezolida) .....	18
3.5 Genes de virulência em <i>Enterococcus</i> sp. ....	18
3.5.1 Substância de agregação – <i>agg</i> .....	19
3.5.2 Proteína de superfície - <i>esp</i> .....	20
3.5.3 Citolisina - <i>cylA</i> .....	21
3.5.4 Adesina de colágeno - <i>ace</i> .....	21
3.5.5 Gelatinase - <i>gelE</i> .....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Coletas das amostras de fezes de macacos da espécie <i>Sapajus nigritus</i> .	23
4.1.1 São Sebastião do Caí – Hospital Sagrada Família .....	25
4.1.2 Santa Cruz do Sul – Gruta do índio.....	26
4.1.3 Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul .....	28
4.2 Isolamento de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> .....	29

4.3	Identificação do gênero pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR ...	30
4.4	Identificação das espécies utilizando a técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz MALDI-TOF e PCR .....	31
4.5	Teste de suscetibilidade antimicrobiana.....	32
4.6	Concentração inibitória mínima (MIC) para amostras não suscetíveis à vancomicina .....	33
4.7	Detecção dos genes relacionados à resistência em <i>Enterococcus</i> sp. ....	34
4.8	Detecção dos genes relacionados à virulência em <i>Enterococcus</i> sp. ....	36
4.8.1	Ensaio para gelatinase.....	37
4.8.2	Ensaio para citolisina.....	37
4.9	Análise estatística .....	38
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	39
5.1	Resultados da distribuição de <i>Enterococcus</i> sp. isolados de amostras de fezes de macacos-prego .....	39
5.2	Resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana .....	40
5.3	Resultados da detecção dos genes relacionados à resistência e virulência.....	45
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
6.1	Distribuição de <i>Enterococcus</i> sp. isolados de amostras de fezes de macacos-prego.....	48
6.2	Suscetibilidade antimicrobiana e genes de resistência presentes em <i>Enterococcus</i> sp. isolados de fezes de macacos-prego.....	50
6.3	Determinantes de virulência presentes em <i>Enterococcus</i> sp. isolados de fezes de macacos-prego .....	58
6.4	Medidas de mitigação, remediação e prevenção da resistência e virulência bacteriana em meio ambiente antropogênico.....	61
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
9.	<b>APÊNDICES</b> .....	89
10.	<b>ANEXO</b> .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das amostras de fezes coletadas de macacos-prego.....	24
Tabela 2: Descrição dos agentes antimicrobianos utilizados no estudo. ....	33
Tabela 3: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes <i>ermB</i> , <i>gyrA</i> , <i>msrC</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetS</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC<sub>1</sub></i> e <i>vanC<sub>2-3</sub></i> . .....	35
Tabela 4: Condições de amplificação utilizadas para genes de resistência <i>ermB</i> , <i>gyrA</i> , <i>msrC</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetS</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> e <i>vanC</i> .....	36
Tabela 5: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR para os genes de virulência <i>ace</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> , <i>geIE</i> e <i>agg</i> .....	38
Tabela 6: Descrição das condições de amplificação utilizadas para genes de virulência <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>esp</i> e <i>geIE</i> .....	38
Tabela 7: Distribuição de <i>Enterococcus</i> sp. isolados (%) de amostras de fezes de macaco-prego oriundos de três regiões diferentes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. ....	40
Tabela 8: Descrição das resistências dos isolados de <i>Enterococcus</i> sp. detectados em amostras de fezes de macaco-prego. ....	42
Tabela 9: Número (%) de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. não suscetíveis detectados em amostras fecais e suabes retais de macaco-prego. ....	43
Tabela 10: Número de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. (%) por localidade, apresentando cada fenótipo de resistência antimicrobiana encontrados em amostras de fezes de macaco-prego. ....	44
Tabela 11: Número de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. (%) com presença de genes relacionados à resistência e virulência em amostras de fezes de macaco-prego. ....	46
Tabela 12: Número de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. (%) com presença de genes relacionados à resistência e virulência em amostras de fezes de macaco-prego. ....	47
Tabela 13: Número de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. (%) com positividade em testes fenotípicos e genotípicos relacionados à virulência em amostras de fezes de macaco-prego. ....	48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa de localização dos remanescentes florestais encontrados nos municípios de Santa Cruz do Sul e São Sebastião do Caí, juntamente com a supressão da vegetação nativa.....27
- Figura 2: Teoria de redes (*network theory*) de potenciais inter-relações epidemiológicas do movimento da resistência antimicrobiana, dentre as populações de macacos-prego das regiões de São Sebastião do Caí e Santa Cruz do Sul. ....52
- Figura 3: Placa informativa para possivelmente implementar nos locais onde os macacos-prego são alimentados com frequência com alimentos industrializados....63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BHA	<i>Buthylated hydroxyanisole</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
D-Ala	D-alanina
D-Lac	D-lactato
DNA	Deoxyribonucleic acid
D-Ser	D-Serina
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
Kg	Quilograma
Km	Quilômetro
km <sup>2</sup>	Quilômetros quadrados
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de sódio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
ng	Nanograma
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RPM	Rotações por minuto
SEMA-RS	Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável
Sp.	Espécie
Spp.	Espécies
tRNA	RNA transportador

U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
v/v	Volume/Volume
WWF	<i>World Wide Fund for Nature</i>
XVI	Dezesseis em romano

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, compreendendo cerca de 103.870 espécies animais diferentes, sendo os primatas destacados como a ordem mais conhecida (Sociedade Brasileira de Primatologia, 2016). Apesar disso, essa diversidade vem sendo afetada em razão das atividades humanas ao longo do tempo (MMA, 2018). Dentre as principais causas que ameaçam a conservação de espécies destacam-se a fragmentação florestal, a qual tende a diminuir a qualidade de habitat do animal, trazendo como principal consequência a dependência da habilidade de adaptação a novas dietas nestes padrões modificados (Bicca-Marques, 2003).

Esta situação torna-se demasiadamente preocupante no momento em que são encontradas bactérias comensais como o *Enterococcus* sp. apresentando resistência à antimicrobianos em populações de animais selvagens (Santos et al., 2013). Este gênero faz parte da família Enterococcaceae, compreendendo cocos Gram-positivos podendo ser agrupados em pares ou cadeias curtas. Anaeróbicos facultativos, a maioria é associada à microbiota intestinal de mamíferos e aves. Quando encontrado fora do ambiente intestinal pode ser interpretado como indicador de poluição (Devriese et al., 2006). Ainda, este gênero possui uma grande variedade de plasmídeos e transposons que são envolvidos na transferência de genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência (Švec e Devriese, 2010), os quais tendem a colaborar com a aquisição e transferências destes fatores (Paulsen et al., 2003).

Em razão do impacto da resistência antimicrobiana de bactérias comensais em animais selvagens em áreas remotas ser pouco conhecido, especialmente próprio da espécie *S. nigrinus*, o trabalho tem como objetivo analisar a presença e caracterização fenotípica e genotípica e resistência antimicrobiana e fatores de virulência de *Enterococcus* sp. em amostras fecais de primatas da espécie *S. nigrinus* em diferentes fragmentos florestais de regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em condições selvagem e cativeiro.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Enterococcus* sp. em amostras de fezes de macaco-prego (*S. nigritus*) selvagens e em cativeiro, bem como verificar o perfil de resistência antimicrobiana e presença de genes de virulência.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar a diversidade de *Enterococcus* sp. em amostras de fezes de macaco-prego selvagens e em cativeiro em diferentes localidades do Rio Grande do Sul – Brasil;
- Analisar a suscetibilidade destas amostras contra antimicrobianos utilizados na terapêutica de humanos e animais;
- Detectar a presença de fatores de virulência e genes de resistência nos isolados de *Enterococcus* sp., utilizando a técnica de PCR convencional;
- Correlacionar a presença das espécies, perfil de resistência e virulência entre *Enterococcus* sp. isolados de animais selvagens e em cativeiro, e relacionar com as ações antropogênicas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Fragmentação Florestal

Grandes extensões florestais transformaram-se em um mosaico de pequenos fragmentos, em decorrência de ações antropogênicas (Zaú, 1998). No século XVI, a Mata Atlântica abrangia uma área equivalente a 1.315.460 km<sup>2</sup>. Atualmente restam 12,5 % dos remanescentes florestais acima de 100 hectares. Considerada *hotspot* mundial, estes remanescentes abrigam 2.208 espécies de vertebrados, 298 espécies de mamíferos e 15.700 espécies de plantas, sendo 8 mil endêmicas. Dentre as pressões que mais ameaçam estas áreas, destacam-se o impacto ambiental causado pelos mais de 145 milhões de brasileiros que habitam suas áreas, consumo excessivo de recursos naturais, lixo, poluição, industrialização, expansão urbana desordenada e exploração predatória de madeira e espécies vegetais (SOS Mata Atlântica, 2016). Dentre os múltiplos fatores que auxiliam na redução florestal, a construção de estradas e produção de soja também contribuem de forma subjacente à fragmentação (WWF, 2018).

Considerada em risco de extinção, a Mata Atlântica está presente na lista das 200 ecorregiões prioritárias para conservação global (Olson e Dinerstein, 2002), uma vez que cerca de 443 espécies de árvores já foram registradas em apenas um hectare de mata. Um fenômeno que vem ocorrendo em razão do empobrecimento generalizado das comunidades vegetais é a defaunação, causando vazios florestais e diminuição da população de animais considerados topos da cadeia alimentar, os quais atuam como reguladores do ecossistema, como a onça-pintada (*Panthera onca*) (WWF, 2017).

Os efeitos da fragmentação na dinâmica da transmissão de patógenos entre primatas e outras espécies, inclusive humanos, são pouco explorados. Goldberg e colaboradores (2008) associaram a fragmentação florestal como a causa da transmissão de bactérias entre humanos/primatas e gado, uma vez que foi encontrada uma similaridade genética entre as cepas oriundas dos grupos estudados. Já Lambais et al. (2006), mostram a grande

diversidade bacteriana presente no dossel de folhas oriundas da Floresta Atlântica. Seu estudo destacou que 97 % das espécies bacterianas encontradas ainda não foram descritas, sugerindo um forte endemismo e diversidade nesta floresta.

Subdividida em 15 ecorregiões terrestres, o Rio Grande do Sul abrange as regiões do Alto Paraná e Floresta Úmida de Araúcaria (WWF, 2017). As reservas do Sudeste da Mata Atlântica as quais localizam-se nos estados do Paraná e São Paulo são consideradas pela UNESCO como Patrimônio Mundial Natural, em decorrência do seu valor universal excepcional (*The United Nations Organization for Education, Science and Culture*, 2018). Com a cobertura florestal reduzindo de forma desacelerada, a pesquisa está mudando sua perspectiva de exploração e descrição para avaliação e reabilitação de organismos (Norconk et al., 2011).

### 3.2 A espécie *Sapajus nigrinus*

Segundo a classificação de Rylands (2012), o gênero *Sapajus* faz parte da família Cebidae e é caracterizado fenotipicamente por macacos capuchinhos robustos, que possuem adornos ou tufo na cabeça, além de outras diferenças craniais e habitats de origem, que os distinguem do gênero *Cebus*. São macacos de tamanho médio os quais possuem moderado dimorfismo sexual, apresentando braços e pernas de mesmo comprimento segundo Alfaro et al. (2012). Pesam aproximadamente 2,5 kg a 5 kg. Conhecido popularmente como macaco-prego, é considerado o maior onívoro dos primatas neotropicais, possuindo aptidão em adaptar sua dieta de acordo com a disponibilidade de alimento, o que faz com que entrem em contato com ampla diversidade de micro-organismos (Fragaszy et al., 2004).

A espécie *S. nigrinus* é nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estendendo a sua distribuição até a província Argentina (Vilanova et al., 2005; *International Union for Conservation of Nature - IUCN*, 2017). No Brasil, podem ser encontrados em diferentes ambientes,

como na natureza, em zoológicos, em centros de reabilitação ou pesquisa, e inclusive em meios urbanos e rurais (Ferreira et al., 2015), sendo alguns destes criados ilegalmente como animais de estimação (Muehlenbein, 2017). Embora abrangente, esta espécie está sujeita a redução de indivíduos em razão da degradação do habitat e a caça em sua área de distribuição. Além disso, é considerada praga em algumas áreas, principalmente em plantações de pinus e cana de açúcar (*International Union for Conservation of Nature - IUCN*, 2017). Endêmica da Floresta Atlântica, a espécie em estudo tem seu habitat em florestas costeiras de planície, florestas montanhosas, florestas montanas, florestas semidecíduais e floresta de Lauraceae (Rylands et al., 1996).

Para compor a energia necessária para o correto funcionamento do organismo, primatas necessitam de alimentos ricos em determinados nutrientes. Carboidratos e fibras são adquiridos em folhas, flores, frutos e sementes; proteínas de folhas, sementes e insetos; e minerais e vitaminas de plantas. Sua alimentação é constituída cerca de 55 % por frutas, 33 % insetos, 8 % sementes, 8 % folhas (principalmente jovens) e 2 % flores (*National Research Council*, 2003). Além da espécie *S. nigritus*, ocorrem também no bioma Mata Atlântica as espécies de primatas *Alouatta belzebul*, *Alouatta caraya*, *Alouatta guariba*, *Brachyteles arachnoides*, *Brachyteles hypoxanthus*, *Callithrix aurita*, *Callithrix flaviceps*, *Callithrix geoffroyi*, *Callithrix jacchus*, *Callithrix kuhlii*, *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Leontopithecus rosalia*, *Cebus flavius*, *Cebus libidinosus*, *Cebus robustus*, *Cebus xanthosternos*, *Callicebus coimbrai*, *Callicebus melanochir*, *Callicebus nigrifrons* e *Callicebus personatus* (Paglia et al., 2011).

A espécie-alvo selecionada para o trabalho foi escolhida primeiramente por se tratar de um possível hospedeiro com estreita relação evolutiva com seres humanos (Wolfe et al., 2007), uma vez que espécies intimamente relacionadas tendem a desenvolver sinais clínicos semelhantes quando infectados por patógenos específicos. Essa característica facilita a transmissão de micro-organismos, como no caso do vírus da imunodeficiência (Sharp e Hahn, 2010), vírus da raiva (Favoretto et al., 2001), vírus Ebola (como

espécie intermediária suscetível) (Leroy et al., 2011), herpesvirus, *Klebsiella* dentre outros agentes infecciosos (Renquist, 1987), podendo servir como espécies indicadoras de patógenos de importância clínica para humanos, como a recente epizootia de febre amarela no Brasil (Leal et al., 2016). Outro critério para seleção destes animais-alvo para o estudo, é o fato de ocuparem uma sobreposição de nicho com seres humanos, como no caso dos animais semi-selvagens ou criados em cativeiro (Calvignac-Spencer et al., 2012).

### 3.3 Gênero *Enterococcus*

*Enterococcus* faziam parte do gênero *Streptococcus* devido a suas características semelhantes, entretanto com o passar dos anos, diversos estudos permitiram a análise e melhor diferenciação entre os gêneros, e uma subdivisão foi realizada a partir de características distintas. Uma das propriedades que diferem os *Enterococcus* de outros gêneros é sua capacidade de crescimento em elevadas concentrações de sal e sua combinação de temperaturas mínimas (10°C) e máximas (45°C) de crescimento, somada a sua habilidade em fermentar o manitol (Sherman, 1937). Esta hipótese foi corroborada em 1984, separando-o definitivamente do gênero dos estreptococos, como resultado de estudos de DNA-DNA e DNA-rDNA realizado por Schleifer e Kilpper-Balz.

Bactéria ácido láctica homofermentativa (onde o ácido láctico é o único produto da fermentação da glicose), hidrolisa a esculina na presença de bile, resultando em um complexo de coloração preta pela ação da esculetina e íons férricos encontrados no meio de cultura. Ainda, o meio de cultura mais utilizado para seu isolamento apresenta azida como agente seletivo (Švec e Devriese, 2010).

Atualmente já foram descritas 57 espécies diferentes de *Enterococcus* (LPSN – *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*, 2018). Algumas destas vêm recebendo atenção referente ao aumento das resistências aos antimicrobianos, principalmente em infecções nosocomiais. Algumas espécies tem potencial para produção e expressão de bacteriocinas,

chamadas enterocinas, ativas contra outros *Enterococcus* assim como outros grupos bacterianos (Švec e Devriese, 2010), fato que os torna cada vez mais estudados no meio científico.

Poucos estudos avaliam a ocorrência de *Enterococcus* sp. em amostras fecais de suabes retais de primatas. O gênero *Enterococcus* foi reportado por Xavier et al. (2010) em amostras fecais de primatas da espécie *Callithrix penicilata* and *Cebus paella* do Centro de Primatas da Universidade de Brasília. Foram avaliadas diversidade de espécies, perfis de resistência e virulência, juntamente a variabilidade genética. Glover (2014) trabalhou com amostras fecais de primatas babuínos e *verver monkeys* localizados em dois centros de reabilitação no sul da África. Foram identificados o gênero *Enterococcus* e estes, testados frente à antibióticos. Recentemente Woods et al. (2017) cultivou o mesmo gênero bacteriano a partir de câmaras de registro cefálica crônica de macacos da espécie *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*, os quais foram testados também para resistência antimicrobiana.

### 3.4 Resistência antimicrobiana em *Enterococcus* sp.

A descoberta de antimicrobianos na história da medicina foi provavelmente o melhor tratamento quimioterápico já desvendado (Aminov, 2010). Na medicina humana, o uso prudente de antibióticos exige que o médico diagnostique qual bactéria é realmente responsável pelos sintomas de determinada patologia, antes de prescrevê-lo (Allen et al., 2010). Por outro lado, na medicina veterinária não existem estas mesmas precauções, utilizando-os na ausência de infecção, como profiláticos e melhora na eficiência alimentar de animais (Landers et al., 2012), selecionando bactérias resistentes em maior ritmo do que a inserção de novos medicamentos no mercado farmacêutico (Garrido et al., 2014).

A ocorrência de *E. faecium* e *E. faecalis* tanto no trato gastrointestinal de animais quanto em alimentos pode constituir um reservatório de genes de resistência. Apesar dessa transferência de genes não ser influência direta para o homem, esses genes podem ser transferidos para

bactérias patogênicas ou para bactérias comensais, podendo ocasionar diferentes riscos à saúde (EFSA/ECDC, 2013). A resistência intrínseca dos enterococos a muitos agentes antimicrobianos comumente utilizados pode ter-lhes permitido uma vantagem cumulativa para a aquisição adicional de genes que codificam resistência de alto nível a aminoglicosídeos, penicilinas, tetraciclina, cloranfenicol e vancomicina (Mundy et al., 2000). Segundo o mesmo autor, há duas principais razões à multirresistência apresentada pelos enterococos: (1) resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos; (2) resistência adquirida através da mobilidade dos genes de resistência em plasmídeos e transposons, e/ou troca cromossômica.

O levantamento de mecanismos de resistência aos antibióticos pode auxiliar na elucidação de novos mecanismos os quais podem emergir clinicamente, bem como servir como base para o desenvolvimento de novos antibióticos (D'Costa et al., 2006). Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos de ação que conferem resistência aos antibióticos, sabemos que alguns organismos e ambientes abrigam genes de resistência a antibióticos independentemente do uso destes compostos (Allen et al., 2010). Como demonstrado por Bhullar et al. (2012), bactérias isoladas de cavernas de mais de quatro milhões de anos em Lechuguilla, México, apresentaram resistência a 14 antimicrobianos distintos, comprovando a capacidade de servirem como reservatório de genes.

Considerando que o tratamento antibiótico é o método primário e, em muitos casos, o único para doenças infecciosas, estudos mais detalhados relacionados a reservatórios ambientais de resistência são cruciais para a futura capacidade de combater e prevenir infecções (Allen et al., 2010).

#### 3.4.1 Resistência aos macrolídeos (*eritromicina (msrC ermB)*)

O primeiro antimicrobiano macrolídeo foi descoberto em 1950, sendo a eritromicina o segundo, em 1952 (Nakajima, 2002). Fazem parte do grupo macrolídeos, lincosamina e estreptogramina (MLS) os quais são quimicamente diferentes, porém possuem um modo de ação similar. São compostos por um

mínimo de dois aminoácidos e/ou açúcares neutros ligados a um anel de lactona de tamanho variável. Possuem como alvo uma estrutura ribossômica conservada associada à síntese proteica bacteriana, com uma alta afinidade à subunidade ribossomal 50S, não se ligando ao ribossomo 80S dos eucariotos (Mao, Putterman e Wiegand, 1970; Hansen, Mauvais e Douthwaite, 1999).

A resistência aos macrolídeos em Gram-positivos ocorre por três principais mecanismos: modificações da sequência alvo mediado por genes *erm*, inativação e efluxo da droga mediado por genes *msr* (Portillo et al., 2000). Os pequenos plasmídeos de resistência MLS não são conjugativos, ou seja, sua transferência é dependente da mobilidade de plasmídeos conjugativos corresidentes, podendo acontecer por meio de fagos (Leclercq e Courvalin, 1991).

Uma das formas que faz com que uma cepa expresse resistência à eritromicina é através de uma modificação pós-transcrição do rRNA 23S por uma N-metiltransferase (metilase) característico de adenina especificada por uma classe de genes de metilação do ribossomo de eritromicina (*erm*) (do inglês - *erythromycin resistance methylase*). A metilação evita que os antibióticos da MLS se liguem ao circuito interno no domínio V no 23S rRNA. A alteração dimetilada na posição A2058 provavelmente dá origem a uma alteração conformacional (mal definida) no RNA, levando a elevada resistência aos antibióticos MLS, porque os sítios de ligação desses fármacos se sobrepõem (Weisblum, 1995; Nakajima, 2002). Por outro lado, a família dos genes *erm* não está sozinha em conferir resistência aos antimicrobianos macrolídeos.

Os genes *msr* pertencem à família transportadora ABC, onde *msrA* é um determinante transmitido por plasmídeo, inicialmente descrito em *Staphylococcus epidermidis*, e *msrC* é uma proteína cromossômica descrita em *E. faecalis*, a qual produz resistência de baixo nível aos macrolídeos (Munita e Arias, 2016). Pertencente à família dos genes responsáveis pela bomba de efluxo, o gene *msrC* possui 62 % de similaridade a nível de DNA e 72 % a nível de aminoácidos com o gene *msrA*, sendo considerado por Portillo et al. (2000) um gene endógeno da espécie *E. faecium*, por estar presente no cromossomo



deste. Porém esta informação foi substituída após trabalho publicado por Werner, Hildebrandt e Witte (2001) onde descreveram que o gene *msrC* não tende a ser igualmente distribuído em todos os isolados de *E. faecium*. Ainda, são considerados proeminentes em termos de sua alta eficiência em relação à expulsão de drogas e substâncias tóxicas a célula, facilitando a multirresistência bacteriana (Sun et al., 2014).

### 3.4.2 Resistência às ansamicinas (rifampicina)

A rifampicina, previamente chamada de rifamicina, foi descrita em 1966 como antimicrobiano sintético, ativo oralmente contra bactérias Gram-positivas e negativas (Maggi et al., 1966). Hartmann e colaboradores (1967) descreveram a ação da rifampicina contra a RNA polimerase bacteriana, prevenindo a iniciação da transcrição. A rifampicina interage diretamente com esta enzima, inativando-a em baixas concentrações (Wehrli, 1983).

Doi et al. (1970) descrevem que a resistência à rifampicina se dá através de uma alteração nas propriedades da polimerase. Mais precisamente Rabussa e Zillig (1969) concluíram que a resistência se dá por uma mudança estrutural na subunidade  $\beta$ , localizada no gene estrutural da polimerase, quando analisadas e comparadas cepas suscetíveis e resistentes a este antimicrobiano. A resistência também pode ser frequentemente associada a mutações nos códons *rpoB* 516, 526 ou 531 da sequência consenso do DNA (Goldstein, 2014).

Por muito tempo, esta droga foi amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e não comumente associada ao tratamento de infecções causadas por *Enterococcus*. Estima-se que as resistências encontradas neste gênero tenham ocorrido em consequência da exposição à droga, durante o tratamento de infecções causadas por bactérias não comensais (Kristich, Rice e Arias, 2014).

### 3.4.3 Resistência às tetraciclinas (*tetM*, *tetL*, *tetS*)

Oxitetraciclina e clortetraciclina foram as primeiras tetraciclinas descritas em 1940, oriundas do *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces aureofaciens* (Chopra and Roberts, 2001). Segundo Epe, Woolley e Harnig (1987), este antimicrobiano age contra o sítio A reduzindo sua afinidade pelo tRNA em cerca de 50 %, agindo na subunidade ribossômica 30S, que é responsável pela combinação de códon-anticódon.

Foi amplamente utilizada como promotor de crescimento na agricultura, em razão de suas propriedades positivas como: atividade contra agentes patogênicos comuns, boa absorção oral, baixa toxicidade, e baixo custo. Prática esta que colabora com o desenvolvimento de bactérias resistentes (Schnappinger e Hillen, 1996).

A resistência às tetraciclinas ocorre em várias bactérias comensais e patogênicas devido à aquisição de genes *tet* (Chopra e Roberts, 2001). Os mecanismos de resistência dos genes *tet* são divididos em dois grupos, onde os genes *tetM* e *tetS* conferem proteção ribossomal à célula e o gene *tetL* codifica proteínas de bomba de efluxo (Chopra e Roberts, 2001; Frazzon et al., 2010).

O gene *tetS* foi detectado em uma cepa de *Listeria monocytogenes* BM4210, descrito por Charpentier, Gerbaud e Courvalin (1994). Este gene confere proteção ribossômica à bactéria e pode se encontrado em plasmídeos auto-transferíveis segundo Charpentier, Gerbaud, e Courvalin (1994). Os mesmos autores também encontraram este gene em cepas de *E. faecalis*, confirmando desta forma a troca de informações genéticas entre *Enterococcus* e *Listeria* spp. na natureza.

Associado aos elementos conjugativos (transposons) da família Tn916-Tn1545 (Clewel et al., 1995), o gene *tetM* tem por característica ser o mais comum dos genes segundo Roberts (2005) e Chopra e Roberts (2001), pelo fato deste gene possuir uma ampla gama de hospedeiros, tanto em bactérias Gram-positivas como negativas. O gene foi isolado por Burdett em 1991, onde foi associado a uma GTPase dependente de ribossomo, sendo a

atividade específica semelhante à atividade correspondente associada ao fator de alongamento G (promove o passo de translocação na síntese de proteínas bacterianas e, juntamente com o fator de reciclagem do ribossomo, a desmontagem do ribossomo pós-terminação) (Savelsbergh et al., 2009).

O mais prevalente mecanismo de resistência às tetraciclínas é através do mecanismo de efluxo, com 28 classes de bombas identificadas (Nguyen et al., 2014). Uma destas bombas é codificada pelo gene *tetL*, o qual confere resistência à tetraciclina e doxiciclina, sendo carregado e mobilizado por plasmídeos conjugativos. Este gene está relacionado principalmente às bactérias Gram-positivas e codificam proteínas capazes de realizar o bombeamento do composto antimicrobiano para o exterior da célula (Chopra e Roberts, 2001; Frazzon et al., 2010).

#### 3.4.4 Resistência à fluoroquinolonas (*ciprofloxacina e norfloxacina* – *gyrA*)

Em 1962, Leshner e colaboradores sintetizaram quimicamente o primeiro antibiótico da classe das quinolonas (Leshner et al., 1962). São chamadas fluoroquinolonas as quinolonas que tiveram a introdução de um flúor em sua conformação química (Aldred et al., 2014). Segundo Hooper (2001) são as únicas drogas inibidoras diretas da síntese de DNA. Através de uma ligação ao complexo enzima-DNA, realiza quebras de cadeias de DNA criadas pela DNA girase e topoisomerase IV. Essas enzimas desempenham papéis essenciais na maioria dos processos de ácidos nucleicos, auxiliando no controle dos níveis de DNA sobrepostos, removendo enrolamento do cromossomo bacteriano. A DNA girase possui duas subunidades: GyrA e GyrB; enquanto topoisomerase IV são ParC e ParE em Gram-negativos e GrlA e GrlB em positivos (Aldred et al., 2014).

São citados pelo menos três mecanismos de resistência às quinolonas: mutação no gene *gyrA*, mutação no gene *gyrB* e mutações relacionadas ao transporte da droga (Nakamura et al., 1989). Porém, segundo Nakanishi et al. (1991) alterações da subunidade A da DNA girase contribuem

em maior grau à resistência às fluoroquinolonas. É desconhecida a resistência à fluoroquinolona em *Enterococcus* através de elementos móveis, sendo principalmente caracterizada por mutação nas subunidades da girase e topoisomerase IV (Murray, 1990). Mutações dos genes *parC* e *gyrA* já foram descritos em *Enterococcus* (López et al., 2011). Estas alterações genéticas afetam as regiões chamadas “determinantes da resistência de quinolona”, alterando a afinidade do alvo com a droga (Miller, Munita e Arias, 2014). Em *gyrA*, esta mutação pontual ocorre mais especificamente no códon 83 (serina para tirosina ou serina para isoleucina) ou no códon 87 (glutamina para glicina) (Petersen e Jensen, 2004).

#### 3.4.5 Resistência aos glicopeptídeos (*vancomicina*)

Os glicopeptídeos agem diretamente na biossíntese do peptideoglicano, inibindo desta forma o crescimento bacteriano. São formados complexos com os terminais do peptídeo D-Ala-D-Ala, precursores de peptidoglicanos na superfície externa da célula, o que impede que as enzimas biossintéticas da parede celular as utilizem como substratos para transglicosilação e transpeptidação e, conseqüentemente, comprometendo a integridade da parede celular (Kristich, Rice e Arias, 2014).

O princípio bioquímico da resistência aos glicopeptídeos se dá por meio de uma modificação no sítio alvo do antibiótico. Bactérias resistentes possuem peptideoglicanos precursores alterados, em que os terminais D-Ala-D-Ala são modificados de modo que terminem em D-Ala-D-lactato ou D-Ala-D-Ser, diminuindo a afinidade do antibiótico com o peptideoglicano. Os *clusters* de genes que conferem resistência são tipicamente referidos pelos nomes dados às ligases as quais codificam (*VanA*, *VanB*, *VanC*, etc.). Os tipos *VanA* e *VanB* são os *clusters* mais comuns entre isolados clínicos e foram estudados com um maior detalhamento (Kristich, Rice e Arias, 2014). Ainda, Noble, Virani e Cree (1992) afirmam que há transferência de genes que conferem resistência à vancomicina de *E. faecalis* para *S. aureus*, corroborando com os achados de Leclercq (1989), onde plasmídeos que conferem resistência foram passados de

*Enterococcus* para demais espécies.

Responsável por especificar a produção de precursores de peptidoglicanos modificados, e formar o dipeptídeo D-Ala-D-Lac, o gene *vanA* é o mediador mais comum que confere resistência à vancomicina nos enterococos, onde sua expressão está sob a regulamentação de dois promotores (Miller, Munita e Arias, 2014). Ainda, há relatos que afirmam que uma cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina (*vancomycin-resistant S. aureus* – VRSA) tenha adquirido o gene *vanA* de uma cepa de *E. faecalis* resistente à vancomicina, ambas isoladas de um mesmo paciente (Chang et al., 2003).

Conferindo de moderada a alta resistência à vancomicina, o gene *vanB* pode ser adquirido pelo transposon Tn5382/Tn1549, o qual pode ocorrer em plasmídeos ou até mesmo no cromossomo do hospedeiro (Kristich, Rice e Arias, 2014).

As resistências à vancomicina podem ser adquiridas, porém em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* tendem a ser intrínsecas quando se tratando do tipo VanC (Courvalin, 2006). O *cluster* de genes *vanC*, o qual localiza-se cromossomicamente, codifica cinco proteínas: VanC<sub>1</sub>, VanXY<sub>C</sub>, VanT, VanR<sub>C</sub>, e VanS<sub>C</sub>. Não obstante, a presença de três destes genes já tem a capacidade de expressar resistência, sendo um deles o gene *vanC*<sub>1</sub> (Arias et al., 2000).

#### 3.4.6 Resistência aos aminoglicosídeos (*gentamicina* e *estreptomicina*)

Estreptomicina foi o primeiro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos descrito. Em 1944, Schatz e colaboradores o caracterizam como uma substância antibacteriana a qual possuía ação contra bactérias Gram-positivas e negativas, produzida por cepas de actinomicetos. Estas drogas perturbam a fidelidade de leitura do polirribonucleotídeo na síntese do polipeptídeo, influenciando na incorporação de aminoácidos (Abou-Zeid et al., 1978). Mais precisamente o composto se liga na região 16S rRNA da subunidade 30S ribossomal interferindo na síntese proteica (Kristich et al.,

2014).

Enterococos podem adquirir genes de resistências a esta classe, expressando enzimas modificadoras da droga, sendo desta forma consideradas resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos (*high-level aminoglycoside resistance* - HLAR). Ainda, a presença do gene *aac(6')-Iaph(2'')-Ia* é associado ao HLAR, demonstrando MIC  $\geq 500$  mg/mL, considerado gene de maior importância clínica em *Enterococcus* (Chow, 2000). Em determinadas infecções causadas pelo *Enterococcus*, usa-se uma combinação de drogas inibidoras de parede celular juntamente com aminoglicosídeo (Herman e Gerding, 1991). Essa associação auxilia na penetração da droga até o citoplasma bacteriano, tornando a bactéria previamente resistente, sensível ao composto (Adhikari, 2010).

Miller et al. (2014) afirmam que os enterococos possuem tolerância intrínseca à aminoglicosídeos, o qual pode ser mediado por dois fatores: a má absorção do antibiótico o qual requer concentrações mais elevadas para promover a entrada no espaço intracelular e a inativação por modificação covalente dos grupos hidroxilo ou amino da molécula levada por enzimas enterocócicas de ocorrência natural, criando um impedimento e diminuindo assim a ligação ao alvo ribossomal. Somente dois aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) são utilizados de forma fiável na prática clínica devido ao fato destes compostos não serem facilmente afetados por enzimas intrínsecas produzidas por enterococos (Miller et al., 2014).

### 3.4.7 Resistência ao fenicol (*cloranfenicol*)

Em 1947, Ehrlich e colaboradores descreveram um novo antibiótico isolado de uma cepa de *Streptomyces* sp., previamente chamado de *Chloromycetin*. Conhecido atualmente como cloranfenicol, este composto atua principalmente ligando-se a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, onde pode também interagir com o ribossomo eucarioto, sendo dessa forma considerado tóxico para as células (Bambeke et al., 2017).

Genes para cloranfenicol acetiltransferase (*chloramphenicol*

*acetyltransferase - cat*) são relacionados a uma modificação enzimática preponderante, que foi observada como subjacente em cepas resistentes à droga (Murray e Shaw, 1997). Genes *cat* vêm sendo descritos em bactérias Gram-positivas e negativas, sendo classificadas de acordo com nível de resistência frente à droga. São geralmente abrigados em elementos geneticamente móveis ou no cromossomo bacteriano (Munita e Arias, 2016).

Um segundo mecanismo de resistência foi descrito em uma cepa de *E. faecalis* V583, a qual apresentou uma taxa de crescimento alterada frente à droga. Os autores relacionaram esta superação frente ao efeito do cloranfenicol com a presença de bombas de efluxo, conferindo resistência a mesma (Aakra et al., 2010). Apesar de suas toxicidades, estudos demonstram que o cloranfenicol é efetivo no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* resistentes à vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci* – VRE) (Norris et al., 1995; Ricaurte et al., 2001).

#### 3.4.8 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos (*ampicilina*)

O primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico foi descoberto e descrito por Alexander Fleming em 1929, logo após perceber que em uma de suas placas de cultura bacteriana havia se desenvolvido um fungo, cujo crescimento interferira no de sua cepa de *Staphylococcus* previamente inoculada (Fleming, 1929). Atuam como inibidores das transpeptidases, prejudicando a síntese da parede celular bacteriana, mimetizando a sequência D-Ala-D-Ala (Bambeke et al., 2017). Em *Enterococcus*, dois mecanismos são responsáveis pela resistência aos  $\beta$ -lactâmicos: proteínas de ligação à penicilina (*Penicillin-binding proteins* - PBP) de baixa afinidade e produção de  $\beta$ -lactamases (Fontana et al., 1990).

Antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos agem pela ligação à PBP, indispensável para o início da ligação cruzada entre peptidoglicanos e conseqüentemente, para formação da parede celular. PBPs modificadas adicionais permitem a síntese de uma parede celular mesmo na presença do antibiótico, tornando desta forma a bactéria resistente ao mesmo. Cada

espécies de *Enterococcus* pode conter até cinco PBPs diferentes. Ainda, espécies já foram diferenciadas através dos padrões dessas proteínas (Williamson et al., 1986).

Os genes para a produção de  $\beta$ -lactamases em enterococos podem estar localizados em plasmídeos, ou no cromossomo bacteriano, expresso pela família dos genes *bla* (Garrido et al., 2014). O alvo destas enzimas é o anel  $\beta$ -lactâmico em bactérias, os quais são hidrolizadas pelas  $\beta$ -lactamases. Coudron e colaboradores (1992) isolaram cepas de *Enterococcus* em diferentes áreas geográficas que, além de possuir a enzima em questão, eram consideradas resistentes à aminoglicosídeos. A presença de  $\beta$ -lactamases é considerada interesse clínico. Para tratamento adiciona-se geralmente um inibidor de  $\beta$ -lactamases como o sulbactam, restaurando desta forma a eficiência do tratamento com o antibiótico (Miller et al., 2014).

#### 3.4.9 Resistência aos nitrofuranos (nitrofurantoína)

Nitrofurantoína foi introduzida na prática clínica em 1952. O exato modo de ação da droga não é bem compreendido, porém sabe-se que este composto inibe uma série de enzimas bacterianas, impedindo o metabolismo de carboidratos em três pontos do ciclo de Krebs, interferindo desta forma em outras funções celulares (Cunha, 1989). Tem sido usada no tratamento de infecções em mulheres grávidas, em função de não ter a capacidade de atravessar a placenta e também no tratamento de VRE em infecções nosocomiais do trato urinário (Cunha, 2006).

Em razão da falta da síntese de novos agentes antimicrobianos, o uso de antibióticos mais antigos, como a nitrofurantoína, vem sendo aplicado ao tratamento de bactérias multirresistentes. A droga usa as flavoproteínas de células bacterianas para as convertê-las em múltiplas formas intermediárias capazes de danificar o DNA, inibindo o metabolismo de carboidratos e interferindo na síntese da parede celular. Uma vez que a aquisição de resistências a este antibiótico é incomum, devido a seu complexo mecanismo de ação, o uso desse agente antimicrobiano vem sendo uma boa opção de



tratamento às infecções e doenças causadas por bactérias (Meena et al., 2017).

#### 3.4.10 Resistência às oxazolidinonas (*linezolida*)

O primeiro antimicrobiano pertencente à classe das oxazolidinonas foi desenvolvido no ano de 1987. Porém, devido aos efeitos tóxicos apresentados em animais, sua fase clínica foi impedida (Slee et al., 1987; Diekema e Jones, 2001). Em 1996, eperezolida e linezolida foram desenvolvidas, não apresentando maiores toxicidades, liberados assim para uso clínico (Brickner et al., 1996; Diekema e Jones, 2001).

As oxazolidinonas agem ligando-se a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo desta forma a síntese proteica (Lin et al., 1997). A resistência à droga ocorre quando ocorrem mudanças no sítio alvo ribossômico. O aparecimento de resistência em cepas clínicas de *Enterococcus* desencadeia uma preocupação em relação à seleção de enterococos resistentes presentes na microbiota intestinal do paciente, quando estes são tratados com a droga (Diekema e Jones, 2001). A presença da mutação G2576U de base única no domínio V do 23S rRNA tem sido associada a mutação de enterococos à linezolida (Marshall et al., 2002; Ruggero et al., 2003; Burleson et al., 2004).

#### 3.5 Genes de virulência em *Enterococcus* sp.

Fatores de virulência auxiliam bactérias a colonizar as células do hospedeiro, causarem doenças e evadirem as defesas do organismo. Podem ser codificados em plasmídeos, cromossomo, transposons e bacteriófagos temperados, podendo integrar-se ao cromossomo bacteriano (Peterson, 1996). Estas atividades metabólicas adicionais como resistência e virulência, que auxiliam a aptidão bacteriana, podem ser encontradas em regiões chamadas ilhas genômicas (Hacker e Kaper, 2000).

Os fatores mais comuns associados à virulência em enterococos são

(1) substância de agregação, (2) proteína de superfície, (3) citolisina, (4) adesina de colágeno e (5) gelatinase. Em *E. faecalis* esses fatores são expressos para facilitar a adesão de bactérias às membranas das células hospedeiras e às superfícies ambientais, onde podem obter nutrientes e evadir a resposta imune do hospedeiro (Medeiros et al., 2014).

Dada a importância da crescente participação dos enterococos em infecções, o estudo da identificação de fatores de virulência associados à invasão ao hospedeiro tornou-se extremamente importante. O desenvolvimento de outros mecanismos para o controle da infecção, como a prevenção da formação de biofilme de enterococos ou a inibição da ação de outros fatores de virulência, pode proporcionar um método alternativo de terapia (Comerlato et al., 2013).

### 3.5.1 Substância de agregação – *agg*

Adesão aos tecidos do hospedeiro é considerado pré requisito para o estabelecimento de uma infecção bacteriana (Koch et al., 2004). Nesses casos pode acontecer a transferência de plasmídeos indutíveis por feromônios, onde células receptoras secretam essa substância no meio, difundindo-se para uma célula doadora potencial. Ao ligar-se, o feromônio inicia uma resposta, ativando a expressão de algumas funções celulares bacterianas, incluindo a síntese da substância de agregação (*aggregation substance* - AS), que pode promover a ligação aos receptores através de um receptor complementar chamado substância de ligação enterocócica (*enterococcal binding substance* - EBS). Esse canal fechado entre células permitem a transferência de plasmídeos do doador para o receptor (Dunny et al., 1995).

Além de promover contato celular, a AS proporcionam adesão às proteínas da matriz extracelular e aumento da hidrofobicidade da superfície celular (Upadhyaya et al., 2009). Trabalho de Kreft e colaboradores (1992) comprovaram que a substância de agregação além de mediar o contato célula-célula, auxilia na adesão da bactéria em células eucariotas, contribuindo para virulência da cepa. Soares et al. (2014) associaram a presença de gene *agg*

com a formação de biofilme em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. Não obstante, a formação de biofilme torna os enterococos mais resistentes aos antibióticos, através da formação desta estrutura de defesa (Mohamed e Huang, 2007).

### 3.5.2 Proteína de superfície - *esp*

Em 1999, Shankar e colaboradores identificaram uma proteína associada à parede celular em *E. faecalis*, chamado de proteína de superfície de enterococos, codificada pelo gene *esp*. Sua associação com amostras patogênicas mostrou que este gene é um potencial determinante de virulência. Cepas que apresentam gene *esp* possuem a capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas (Toledo-Arana et al., 2001), fazendo parte de uma ilha de patogenicidade (Shankar et al., 2002). Por isso, *esp* pode ser considerado um importante determinante de adesão e formação de biofilme em *Enterococcus* sp. (Heikens et al., 2007). Além de promover a adesão, colonização e evasão do sistema imunológico (Moreno et al., 2006), a proteína de superfície de enterococos também vem desempenhando algum papel na resistência aos antibióticos (Fisher e Phillips, 2009). Com base nestas informações, Medeiros e colaboradores (2014) encontraram o gene *esp* somente em amostras clínicas, sendo que em amostras alimentares foi observada a ausência deste mesmo fator de virulência.

A presença do gene *esp* serve como método de rastreamento de poluição fecal humana no meio ambiente. Scott e colaboradores (2005) identificaram a presença deste gene em 97 % de amostras oriundas de esgoto, porém não detectado em lagoas de resíduos de gado ou amostras fecais de aves e outros animais. Os pesquisadores utilizaram a técnica de Rastreamento de Fontes Microbiana (*Microbial Source Tracking* - MST), apontando índice de poluição fecal humana através dos achados genéticos.

### 3.5.3 Citolisina - *cylA*

A toxina citolisina é a única toxina bacteriana com habilidade em lisar tanto células bacterianas como eucarióticas. Foi primeiramente identificada como uma hemolisina, porém com estudos posteriores foi confirmada sua classificação como um membro divergente da família das bacteriocinas lantibióticas (Carniol e Gilmore, 2006). A associação entre a expressão de citolisina e virulência em *Enterococcus* vem sendo reportada ao longo dos anos (Ike et al., 1987; Furumura et al., 2006; Zheng et al., 2017).

Citolisina é mediada por um *operon* auto-transmissível e também pode ser encontrada em ilhas de patogenicidade, localizadas no cromossomo bacteriano (Shankar et al., 2002). O operon é composto por oito genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylL<sub>S</sub>*, *cylL<sub>L</sub>*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*. Este é subdividido em duas unidades transcricionais. A primeira unidade é composta pelos genes estruturais da citolisina (*cylL<sub>L</sub>* e *cylL<sub>S</sub>*), funções pós-tradução e secreção (*cylM*, *cylB* and *cylA*) e produção da imunidade celular (*cylI*). A segunda unidade é composta pelos genes regulatórios *cylR1* e *cylR2* (Coburn e Gilmore, 2003). A hemolisina também pode possuir papel na aquisição de ferro através da lise dos eritrócitos, liberação da hemoglobina, ou ainda, estar envolvida em doenças gastrointestinais (Janda e Abbott, 1993).

### 3.5.4 Adesina de colágeno - *ace*

Adesina de colágeno (*Ace*) é pertencente à família das adesinas de componente de superfície microbiana de reconhecimento de molécula de matriz adesiva (*Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule* - MSCRAMM) de ligação ao colágeno em enterococos (Rich et al., 1999). Como a colonização em tecidos é o primeiro evento da patogenicidade bacteriana, esta adesina apresenta papel importante na virulência da cepa que as possui, em razão de que o colágeno é a proteína mais abundante em vertebrados (Patti et al., 1994).

Nallapareddy e colaboradores (2011) afirmaram que em mutante bacteriano sem o gene *ace*, sua expressão foi claramente atenuada, sugerindo que Ace é considerada um importante fator de virulência. A expressão de *ace* tende a ser aumentada por estímulos ambientais, como na presença de sais biliares e variações de temperaturas (Lebreton et al., 2009). A Ace se liga ao colágeno através de um mecanismo chamado *collagen hug*, o qual ocorre em vários passos, onde dois subdomínios cooperam para envolver e "abraçar" a estrutura de um monômero de colágeno. Esta expressão foi primeiramente descrita em *S. aureus* no fator de virulência Cna (Zong et al., 2005), sendo apresentada sua estreita similaridade com enterococos ao comparado com fator Ace (Liu et al., 2007).

### 3.5.5 Gelatinase - *gelE*

Pensa-se que o papel principal tanto da gelatinase (GelE) como da serina protease na patogênese enterocócica seja proporcionar nutrientes às bactérias por degradação do tecido hospedeiro, embora também tenham alguma função na formação de biofilmes (Mohamed e Huang, 2007). O gene *gelE* que codifica a GelE está localizado no cromossomo bacteriano e é regulado de uma forma dependente da densidade de células (Fisher e Phillips, 2009). A gelatinase hidrolisa a gelatina do tecido do hospedeiro em subcomponentes tais como polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos (Elavarashi et al., 2017), reduzindo a viscosidade das soluções de gelatina (Levin et al., 1965).

Este fator de virulência é o principal mediador de patogenicidade em endocardites (Thurlow et al., 2010). Para a secreção da protease gelatinase é necessário a presença do locus regulatório *fsr*, que é composto por três genes: *fsrA*, *fsrB*, e *fsrC*. Portanto, para formação de biofilme juntamente à gelatinase, o sistema *fsr* é de extrema importância (Hancock e Perego, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coletas das amostras de fezes de macacos da espécie *Sapajus nigrinus*

Foram coletadas 25 amostras de fezes e suabes retais de macacos da espécie *S. nigrinus* tanto de vida selvagem como de cativeiro (zoológico) (Tabela 1).

Os animais selvagens foram capturados e manipulados pelos médicos veterinários do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) utilizando armadilhas tipo Tomahawk. Os animais foram contidos e anestesiados para a obtenção das amostras. Foram administrados pelos médicos veterinários do IBAMA doses intramusculares de Cetamina (100 mg / mL) e Xilazina (20 mg / mL) de acordo com o peso e condição de cada animal, onde foi estabelecida a quantidade dos produtos utilizando a fórmula peso x dose / concentração do anestésico. Os animais no zoológico estavam em recuperação no setor de triagem e quarentenário, e em razão de terem sido apreendidos de criatórios ilegais, não necessitaram de anestesia. Todos os animais foram classificados de acordo com sexo e faixa etária.

Amostras retais foram coletadas a partir do reto dos animais com a ajuda de suabes estéreis e luvas, armazenados em meio de transporte Stuart (Kasvi, Paraná, Brasil) (Anvisa, 2004) e transportadas até o Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Amostras fecais foram coletadas quando os animais defecaram nas gaiolas, individualmente ou em grupos, como no caso dos animais de cativeiro. No final da coleta, todos os animais foram devolvidos a seu habitat e / ou gaiolas. Os suabes retais e amostras fecais individuais desses macacos-prego foram coletados entre os meses de agosto de 2016 a novembro de 2017 em diferentes fragmentos florestais de regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Um dos pontos de coleta dos animais foi os intermédios florestais próximos ao Hospital Sagrada Família, no município de São Sebastião do Caí (Latitude: -29.58804585, Longitude: 51.36499495, Elevação: 108 m). O segundo local de coleta foi o fragmento florestal encontrado na cidade de Santa Cruz do Sul, no Parque da Gruta do Índio (Latitude: -29.7108384, Longitude: -52.4098881, Elevação: 110 m). Os animais de cativeiro foram coletados no Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (Latitude: -29.802078, Longitude: -51.166460, Elevação: 23 m). Todas as coletas dos animais selvagens foram licenciadas e autorizadas em parceria com o IBAMA e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO-CERAM número 56540). As amostras do zoológico foram coletadas pelos veterinários responsáveis.

Tabela 1: Descrição das amostras de fezes coletadas de macacos-prego.

Local de coleta	Identificação	Origem da amostra	Faixa etária	Sexo	Peso (g)
São Sebastião do Caí (SSC)	MP1	Amostra fecal (individual)			
	MP3	Amostra fecal (individual)			
	MP4	Amostra fecal (individual)			
	MP9	Suabe retal	Juvenil	Feminino	1,520
	MP10	Suabe retal	Adulto	Feminino	3,030
	MP11	Suabe retal	Adulto	Feminino	2,400
	MP12	Suabe retal	Adulto	Feminino	2,075
	MP13	Suabe retal	Juvenil	Feminino	1,900
	MP14	Suabe retal	Juvenil	Masculino	1,560
	MP15	Suabe retal	Juvenil	Masculino	2,200
	MP17	Amostra fecal (grupo)			
Santa Cruz do Sul (SCS)	MP21	Amostra fecal (grupo)			
	MP22	Amostra fecal (grupo)			
	MP24	Suabe retal	Adulto	Masculino	3,170
	MP25	Suabe retal	Jovem	Masculino	1,900
	MP26	Suabe retal	Adulto	Feminino	2,270
	MP27	Suabe retal	Adulto	Masculino	2,000
	MP28	Suabe retal	Adulto	Masculino	2,200
	MP29	Amostra fecal (grupo)			
Zoológico (ZOO)	MP16	Amostra fecal (individual)			
	MP18	Amostra fecal (individual)			
	MP19	Amostra fecal (individual)			
	MP20	Amostra fecal (individual)			
	MP30	Amostra fecal (grupo)			

MP: Macaco-prego

#### 4.1.1 São Sebastião do Caí – Hospital Sagrada Família

São Sebastião do Caí está localizado no Estado do Rio Grande do Sul, a 60 km de Porto Alegre. Consta com aproximadamente 21.932 habitantes. É banhado pelo rio Caí, no trecho baixo Caí, apresentando terrenos mais planos e áreas mais baixas (IBGE, 2017; São Sebastião do Caí, 2018; SEMA, 2018). Segundo o atlas remanescente de 2016 (SOS Mata Atlântica), a cobertura original de Mata Atlântica do município de São Sebastião do Caí abrangia 100 % de sua extensão. Hoje, seu remanescente conta com 2 % de vegetação, totalizando 246.59 hectares de mata (Figura 1).

O Hospital Sagrada Família, encontrado nesta cidade, foi inaugurado em 14 de Março de 1937, e atualmente permanece em funcionamento. Conta com uma equipe de 176 colaboradores e dispõe de 89 leitos (Hsagradafamilia et al., 2018). Localizado junto a um fragmento florestal de cerca de 1,61 km, é encontrada a Estação de Tratamento de Água (ETA) da CORSAN do município, localizado a aproximadamente 212 metros do local, possuindo aproximadamente 48 metros de extensão hídrica. O hospital informou que os efluentes oriundos da lavanderia passam por fossa e filtro e após, são destinados à rede pública de tratamento de efluentes (informação verbal)<sup>1</sup>.

As coletas foram realizadas neste fragmento localizado na parte posterior ao hospital, onde um bando de macacos-prego, composto de 30 a 50 indivíduos, habita. Estes animais recebem alimentação diretamente da população dos arredores da mata, composta na maior parte por frutas da estação (informação verbal)<sup>2</sup>. As coletas foram realizadas no dia 23 de Agosto de 2016.

---

<sup>1</sup> Informação concedida pela administração do Hospital Sagrada Família

<sup>2</sup> Informação concedida pelo médico veterinário do IBAMA, Paulo Guilherme Carniel Vagner em Maio de 2017.



#### 4.1.2 Santa Cruz do Sul – Gruta do Índio

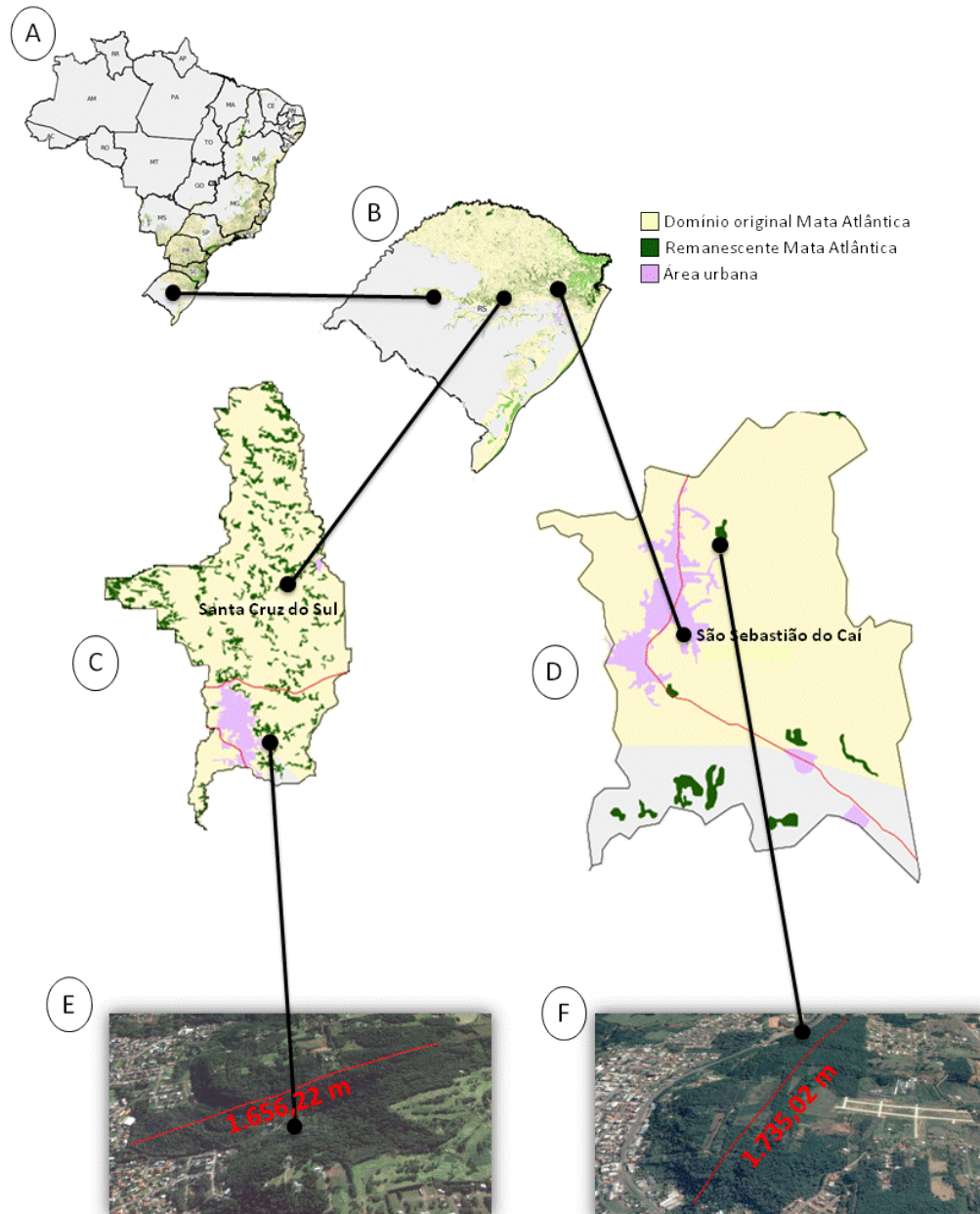
No estado do Rio Grande do Sul, o município de Santa Cruz do Sul está localizado a 155 km da cidade de Porto Alegre. Consta com aproximadamente 118.374 habitantes, fazendo parte da região conhecida como Vale do Rio Pardo (IBGE, 2016; Santa Cruz do Sul, 2017). Segundo o atlas remanescente de 2016 (SOS Mata Atlântica), a cobertura original de Mata Atlântica do município de Santa Cruz do Sul abrangia 84 % de sua extensão. Hoje, seu remanescente conta com 13 % de vegetação, totalizando 7.740,81 hectares de mata (Figura 1).

O Parque da Gruta do Índio localizado nesta mesma cidade é situado a 2 km do centro do município. Com área de 17,4 hectares, o Parque dispõe de cavernas, trilhas em meio à mata nativa, cascatas, pedalinho e uma infraestrutura completa com churrasqueiras, banheiros, *playground*, restaurante e lanchonete. Em 2016 passou a abrigar também o chamado Parque de Aventuras, com equipamentos como tirolesa, parede de escalada e trilhas de arvorismo (Santa Cruz, 2017). As coletas foram realizadas neste fragmento florestal do Parque, onde vive um bando de macacos-prego composto por 30 a 50 indivíduos. Por ser um parque aberto para visitação, os macacos ali encontrados são frequentemente alimentados com uma dieta totalmente industrializada e humanizada, composta por salgados, doces, frituras, carboidratos entre outros compostos, oferecidos pelos visitantes do local (informa o verbal)<sup>3</sup>. Estas coletas foram realizadas no dia 23 de Maio de 2017.

---

<sup>3</sup> Informa o concedida pelo médico veterinário do IBAMA, Paulo Guilherme Carniel Vagner em Maio de 2017.

Figura 1: Mapa de localização dos remanescentes florestais encontrados nos municípios de Santa Cruz do Sul e São Sebastião do Caí, juntamente com a supressão da vegetação nativa.



Fonte: Adaptado SOS Mata Atlântica e Google Earth.

Ao topo mapa do Brasil (A). Ao centro mapa do Rio Grande do Sul mostrando os locais de coleta das amostras (B). A direita extensão da cidade de São Sebastião do Caí (C) e a esquerda extensão da cidade de Santa Cruz do Sul (D), mostrando a supressão da vegetação nativa. Abaixo fragmentos florestais das cidades de Santa Cruz do Sul (E) e São Sebastião do caí (F), mostrando os locais de coleta.

#### 4.1.3 Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul

O Parque Zoológico está situado no município de Sapucaia do Sul, região metropolitana a 30 km de Porto Alegre. Sua área total compreende cerca de 160 hectares, abrigando em torno de 130 espécies de animais.

Os animais recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS - IBAMA) são entregues ao Zoológico para cuidados e adaptação ao local. Muitas vezes, chegam ao Zoológico sem condições de retornarem à natureza, fazendo com que permaneçam definitivamente em condições de cativeiro. Dentre os primatas acolhidos no Zoológico de Sapucaia do Sul, são encontradas as espécies *Alouatta guariba*, *Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus*, *Ateles chamek*, *Aotus Nigriceps*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Callithrix jacchus* e *Callithrix geoffroyi* (ZOO FZB, 2018).

A dieta destes macacos é composta por ração extrusada própria para primatas, da marca Nuvilab Primatas Neotropicais, complementada por frutas e hortigranjeiros. Sua composição básica é constituída por: milho pré-gelatinizado, farelo de soja, leite integral em pó, farinha de carne e ossos, farinha de arroz gelatinizada, soro de leite em pó, açúcar, óleo de soja refinado, cloreto de sódio, concentrado proteico de soja, protenose, levedura de cana, ovo em pó, feno de alfafa, polpa de beterraba, farinha de vísceras de aves, calcário calcítico, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, aroma de baunilha, aroma de banana, aroma de frutas vermelhas, mananoligossacarídeo, frutoligossacarídeo, aditivo adsorvente de micotoxinas, extrato de yucca, hexametáfosfato de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, zinco aminoácido quelato, manganês aminoácido quelato, proteinado de selênio, triptofano, BHT e BHA (Anexo 1).

As amostras MP16, MP18, MP19 e MP20 foram coletadas de animais que defecaram nas gaiolas de apreensão individualmente em

Setembro de 2016; e MP30 foi coletada a partir de um *pool* de fezes do grupo de animais habitantes do zoológico, recolhidas no início do dia pelo responsável pela limpeza do local em Novembro de 2017.

#### 4.2 Isolamento de bactérias do gênero *Enterococcus*

Para isolamento de *Enterococcus* sp. foi utilizada metodologia descrita por Cassenego et al. (2011) e Nachtigall et al. (2013) com algumas modificações. Para amostras fecais, foi pesada a quantidade de 0,1 g de fezes e incubadas em água peptonada tamponada (Himedia, Mumbai, Índia) para pré-enriquecimento não seletivo a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Para as amostras de suabes retais, estes foram incubados diretamente em água peptonada tamponada (Himedia, Mumbai, Índia) para pré-enriquecimento não seletivo a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Após esses processos, uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi inoculada em 9 mL de caldo azida dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. O plaqueamento foi realizado pela técnica de espalhamento em superfície (*Spread Plate*), em triplicata, onde 0,1 mL do caldo azida cultivado foi disposto em ágar infusão de cérebro e coração (BHIA) (Acumedia, Lansing, Michigan) suplementado com 6,5 % de Cloreto de Sódio (NaCl - Nuclear®). As placas foram incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Foram selecionadas 15 unidades formadoras de colônia que apresentaram crescimento isolado suspeito do gênero (UFCs menores) para análise. Estas foram plaqueadas em ágar bile esculina (Himedia Mumbai, Índia) e incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Os isolados que apresentaram características morfológicas (colônias regulares e circulares com superfície lisa, contendo até 5 mm de diâmetro (Švec e Devriese, 2010) e tintoriais (meio enegrecido por hidrolisar esculina na presença de 40 % de sais biliares (Facklam, 1973)) para o gênero pesquisado foram repassadas para caldo e ágar BHI (Acumedia, Lansing, Michigan) e incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Após crescimento das colônias, foram realizados os testes de coloração

de Gram, catalase e a extração de DNA pelo método de lise térmica conforme Donato (2007), onde no *pellet* das culturas puras pré incubadas em caldo BHI, adiciona-se uma solução alcalina contendo SDS (dodecyl sulfato de sódio) que é um detergente removedor de lipídeos da membrana celular, seguido de tampão TE, que contém 10 mM Tris para estabilizar o pH e EDTA que sequestra o cálcio e o magnésio para preservar o material (DNA).

Foi utilizado Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer para mensurar a concentração de DNA das amostras e sua pureza utilizando razão 260/280.

Todas as amostras foram armazenadas em criotubos a -20°C em uma solução contendo 1 mL de meio para preservação (solução de 10 % de leite desnatado e 10 % de glicerol) (Cody et al., 2008) junto a uma alíquota da cultura bacteriana isolada.

#### 4.3 Identificação do gênero pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A verificação da presença do gênero bacteriano foi confirmada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em Termociclador – 2720 *Thermal Cycler*® (*Applied Biosystem*, Califórnia, EUA), utilizando oligonucleotídeos iniciadores gênero-específico: 5'– TACTGACAAACCATTCATGATG –3' e 5'– AACTTCGTCACCAACGCGAAC – 3' (Ke et al., 1999) referentes à amplificação do gene *tuf*, responsável por codificar o fator de alongamento EF-Tu, o qual é encontrado em um dos *operons* mais conservados na evolução dos procariotos (Putzer e Laalami, 2013). Como controle positivo foi utilizada a cepa referência *E. faecalis* ATCC 29212 (*American Type Culture Collection*).

A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. A PCR foi realizada nas condições

de 3 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR, foram aplicados 8 µL de cada amostra em um gel com concentração de 1,5 % de agarose, dissolvido em tampão tris-acetato-EDTA 1x (TAE) corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma tensão de 50 volts por 75 minutos para a migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada em Transiluminador L.Pix (*Loccus Biotecnologia*®, *Molecular Imaging*). Foram interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmento com tamanho aproximado de 112 pares de bases.

#### 4.4 Identificação das espécies utilizando a técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz MALDI-TOF e PCR

A técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) foi aplicada aos isolados de *Enterococcus* sp. de acordo com protocolo previamente descrito por Sauget et al. (2017). Primeiramente foi realizada uma suspensão bacteriana dos isolados em 300 µL de água estéril. Após, a adição de 900 µL de etanol absoluto, onde a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante dessa suspensão foi descartado e o *pellet* foi resuspendido em 50 µL de ácido fórmico (70 % v/v). Posteriormente foram adicionados 50 µL de acetonitrila. O microtubo foi centrifugado a 10.000 rpm durante 2 minutos, e 1 µL deste sobrenadante foi transferido para o MALDI. Após a secagem, foi adicionado 1 µL de ácido  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamico (Bruker Daltonik GmbH) neste sobrenadante seco. A cepa *Escherichia coli* 1917 Nissle foi utilizada como controle positivo e também como padrão de calibração. A análise MALDI-TOF foi realizada utilizando um microflex LT Bruker espectrômetro de massa (Bruker Daltonik GmbH) e os espectros foram automaticamente identificados utilizando programa BrukerBioTyper™ 1.1.

Foram atribuídas classificações às amostras em razão do *score* apresentado, sendo: identificação de espécies altamente provável (range entre 2300 e 3000), identificação segura do gênero, identificação provável de espécie (range entre 2000 e 2299), provável identificação de gênero (range entre 1700 e 1999) e identificação não confiável (range entre 0 e 1699).

Por indisponibilidade do equipamento MALDI-TOF, algumas amostras foram identificadas através da técnica de PCR (Apêndice 1). Foram identificadas as espécies *E. faecalis* e *E.hirae* através da utilização de oligonucleotídeos espécies-específicos e condições específicas de amplificação: para *E. faecium* foi utilizada a temperatura de anelamento de 62°C para amplificação de fragmento na altura de 172 pb com os oligonucleotídeos 5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3' e 5'-CGGAAGTGATGCTTCCTACTG-3' utilizando controle positivo a amostra F12 (Medeiros et al., 2014; Medeiros, 2011); para *E. hirae* foi utilizada a temperatura de anelamento de 62°C para amplificação de fragmento na altura de 94 pb com os oligonucleotídeos 5'-TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA-3' e 5'-TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC-3' utilizando controle positivo a amostra C1 (Prichula et al, 2016; Santestevan et al., 2015);

#### 4.5 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Para determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* frente aos agentes antimicrobianos foi utilizada a metodologia de disco-difusão (CLSI, 2016). As amostras foram padronizadas em solução salina 0,85 %, com turbidez semelhante à solução padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e avaliadas quanto à suscetibilidade aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), linezolid (LNZ), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), rifampicina (RIF), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN) (Tabela 2).

Em cada placa de Petri foram adicionados seis discos antimicrobianos nas concentrações citadas (Tabela 2), colocados respeitando a

distância de 24 mm entre seus centros e pressionando-os levemente para fixá-los no ágar Müeller Hinton (Kasvi, Curitiba, Brasil). Estas placas foram incubadas a 35 °C ±1 °C, durante 18 a 24 horas. O diâmetro dos halos de inibição de crescimento foi analisado e as amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes, através das faixas de interpretação específica para *Enterococcus* sp. (CLSI, 2016).

Tabela 2: Descrição dos agentes antimicrobianos utilizados no estudo.

Classe	Antimicrobiano	Sigla	Concentração	Alvo bacteriano
Aminoglicosídeos	Gentamicina	GEN	120 µg	Síntese proteica
	Estreptomicina	EST	300 µg	
Beta-lactâmicos	Ampicilina	AMP	10 µg	Síntese da parede celular
Fenicol	Cloranfenicol	CLO	30 µg	Síntese proteica
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5 µg	Síntese DNA
	Norfloxacina	NOR	10 µg	
Glicopeptídeos	Vancomicina	VAN	30 µg	Síntese da parede celular
Macrolídeo	Eritromicina	ERI	15 µg	Síntese proteica
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	NIT	300 µg	Síntese DNA
Oxazolidinonas	Linezolida	LNZ	30 µg	Síntese proteica
Rifampicina	Rifampicina	RIF	5 µg	Síntese RNA
Tetraciclina	Tetraciclina	TET	30 µg	Síntese proteica

Amostras que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas com perfil de múltipla resistência (PMR) (EFSA e ECDC, 2013).

#### 4.6 Concentração inibitória mínima (MIC) para amostras não suscetíveis à vancomicina

Os isolados que demonstraram resultados intermediários ou resistentes ao antimicrobiano vancomicina (30 µg) pelo método de disco difusão foram analisados em relação à concentração mínima inibitória (MIC)



conforme recomendações do CLSI (2016). As concentrações testadas foram de  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As amostras foram pipetadas em duplicata em microplaca 96 poços a partir da primeira coluna, sendo as duas últimas reservadas para os controles positivo (*S. aureus* ATCC 29213) e negativo (caldo e antimicrobiano), respectivamente. A placa foi incubada a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 16 a 20 horas. A leitura da placa foi realizada conforme CLSI (2016), onde a concentração mínima inibitória foi considerada a menor concentração em que não houve crescimento microbiano.

#### 4.7 Detecção dos genes relacionados à resistência em *Enterococcus* sp.

As amostras resistentes ou intermediárias a determinados antimicrobianos foram selecionadas para caracterização genética de resistência antimicrobiana. Os isolados resistentes ou intermediários foram testados por PCR para detecção dos seguintes genes: *ermB* e *msrC* (em isolados resistentes ou intermediários à eritromicina), *gyrA* (em isolados resistentes ou intermediários à ciprofloxacina e norfloxacina), *tetL*, *tetM*, *tetS* (em isolados resistentes ou intermediários à tetraciclina) e *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub> (em isolados resistentes ou intermediários à vancomicina) (Tabela 3 e 4).

A reação da PCR foi realizada utilizando Termociclador – 2720 Thermal Cycler® (Marca Applied biosystem, Califórnia, EUA), segundo as condições descritas na tabela 4, em volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 0,4  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (4G®), 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação.

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR, foram aplicados 8  $\mu\text{L}$  de cada amostra em um gel com concentração de 1,5 % de agarose, dissolvido em tampão tris-acetato-EDTA 1x (TAE) corado com *Blue*

*Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma tensão de 50 volts por 75 minutos para a migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging). Foram interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmento nos tamanhos citados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes *ermB*, *gyrA*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB*, *vanC<sub>1</sub>* e *vanC<sub>2-3</sub>*.

Nome do primer	Gene	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Referência	Cepa controle
<b>erm(B)_F</b> <b>erm(B)_R</b>	<i>ermB</i>	GAAAAGGTAAGTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	547	Sutcliffe et al. (1996)	485 (Medeiros AW, 2011)
<b>gyrA F</b> <b>gyrA R</b>	<i>gyrA</i>	ATGAACGAATTGGGTGTG AATTTTACTCATACGTGCTT	250	Rathnayake et al. (2011)	MP12.3 ( <i>E. durans</i> ) (Neste trabalho)
<b>msrC 3</b> <b>msrC 4</b>	<i>msrC</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG GTAAACAAAATCGTTCCCG	343	Werner et al. (2001)	P6.7 (Prichula J, 2015)
<b>tet(L)_F</b> <b>tet(L)_R</b>	<i>tetL</i>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTTAACACG	625	Frazzon et al. (2010)	P4.1 (Prichula J, 2015)
<b>tet(M)_F</b> <b>tet(M)_R</b>	<i>tetM</i>	GTTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	Aarestrup et al. (2000)	P6.7 (Prichula J, 2015)
<b>tet(S)_F</b> <b>tet(S)_R</b>	<i>tetS</i>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT ACATAGACAAGCCGTTGACC	720	Aarestrup et al. (2000)	C12 (Medeiros AW, 2011)
<b>van(A)_F</b> <b>van(A)_R</b>	<i>vanA</i>	TAATTGAGCAGGCTGTTTCG TACTGCAGCCTGATTTGGTC	80	Moura et al. (2015)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<b>vanB</b> <b>vanB</b>	<i>vanB</i>	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTCGTTCCCTCGACC	635	Dutka-Malen et al. (1995)	<i>E. faecalis</i> ATCC 700802
<b>vanC<sub>1</sub></b> <b>vanC<sub>1</sub></b>	<i>vanC<sub>1</sub></i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dutka-Malen et al. (1995)	<i>E. gallinarum</i> 11 (Medeiros AW, 2011)
<b>vanC<sub>2-3</sub></b> <b>vanC<sub>2-3</sub></b>	<i>vanC<sub>2-3</sub></i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439	Dutka-Malen et al. (1995)	<i>E. casseliflavus</i> J21 (Santestevan et al., 2015)

pb: pares de base

Tabela 4: Condições de amplificação utilizadas para genes de resistência *ermB*, *gyrA*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB* e *vanC*.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	°C	T	°C	T	°C	T	°C		T
<i>ermB</i>	3min	93	35	93	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Sutcliffe et al., 1996
<i>gyrA</i>	5min	94	40	94	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Neste trabalho
<i>msrC</i>	5min	94	35	94	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Werner et al., 2001
<i>tetL</i>	5min	94	35	94	1min	58	1min	72	1min	72	5min	Frazzon et al., 2010
<i>tetM</i>	5min	94	35	94	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Aarestrup et al., 2000
<i>tetS</i>	5min	94	35	94	1min	58	1min	72	1min	72	5min	Choi e Woo, 2015
<i>vanA</i>	5min	94	35	94	1min	56	1min	72	1min	72	10min	Moura et al., 2015
<i>vanB</i>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al., 1995
<i>vanC</i> <sub>1</sub>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al., 1995
<i>vanC</i> <sub>2/3</sub>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al., 1995

T: Tempo; °C: Temperatura

#### 4.8 Detecção dos genes relacionados à virulência em *Enterococcus* sp.

A presença dos genes de virulência *ace* (adesina de colágeno), *agg* (substância de agregação) e *esp* (proteína de superfície de enterococos) foram avaliados em todos os isolados bacterianos. Já para *cylA* (citolisina) e *gelE* (gelatinase) foram avaliadas as amostras que apresentaram positividade no teste fenotípico. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 5.

As reações da PCR foram otimizadas utilizando Termociclador – 2720 Thermal Cycler® (Marca Applied biosystem, Califórnia, EUA) segundo as condições descritas na Tabela 6, em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. A reação para detecção do gene *agg* foi igual às demais com exceção da quantidade de DNA, a qual foi empregada na concentração de 200 ng.

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR, foram aplicados 8 µL de cada amostra em um gel de agarose a 1,5 % diluído em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC

Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma tensão de 50 volts por 75 minutos para a migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging). Foram interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmentos de tamanhos citados na Tabela 5.

#### *4.8.1 Ensaio para gelatinase*

Foi realizado o ensaio de gelatinase segundo Marra et al. (2007). Um inóculo da cultura bacteriana pura foi perfurado em tubos contendo 12 % de gelatina (Labsynth®) em 0,8 % de caldo BHI (Himedia®). Os tubos foram incubados a 35 °C ±1 °C durante 24 horas e posteriormente refrigerados a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras que apresentaram o meio liquefeito foram consideradas positivas. Quando o meio contendo gelatina se apresentou intacto (estado semi-sólido), a bactéria foi caracterizada como não produtora de gelatinase.

#### *4.8.2 Ensaio para citolisina*

O ensaio para citolisina foi realizado segundo Brenden e Janda (1987), onde as amostras foram estriadas em placas contendo blood agar base (Himedia®) contendo 5 % de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 35 °C ±1 °C durante 24 horas e foram examinadas as zonas de hemólise, as quais se estenderam a partir da borda do crescimento bacteriano.

Tabela 5: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR para os genes de virulência *ace*, *cyIA*, *esp*, *geIE* e *agg*.

Nome do primer	Gene	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Referência	Cepa controle
<b>ace1_F</b> <b>ace2_R</b>	<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	Mannu et al. (2003)	C12 (Medeiros AW, 2011)
<b>cyIA_TE17</b> <b>cyIA_TE18</b>	<i>cyIA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTC	517	Eaton e Gasson (2001)	14 (Medeiros AW, 2011)
<b>ESP46</b> <b>ESP47</b>	<i>esp</i>	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	913	Shankar et al. (1999)	14.3 (Neste estudo)
<b>geIE_F</b> <b>geIE_R</b>	<i>geIE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	402	Eaton e Gasson (2001)	C12 (Medeiros AW, 2011)
<b>agg TE3</b> <b>agg TE4</b>	<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton e Gasson (2001)	M2.15 (Neste estudo)

pb: pares de base

Tabela 6: Descrição das condições de amplificação utilizadas para genes de virulência *ace*, *agg*, *cyIA*, *esp* e *geIE*.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	°C	T	°C	T	°C	T	°C		T
<b>ace</b>	5min	94	35	94	1min	57	1min	72	1min	72	5min	Mannu et al., 2003
<b>agg</b>	5min	94	30	94	1min	62	1min	72	1min	72	10min	Eaton e Gasson, 2001
<b>cyIA</b>	5min	94	35	94	1min	54	1min	72	1min	72	5min	Shankar et al., 1999
<b>esp</b>	3min	94	35	94	1min	64	1min	72	1min	72	5min	Eaton e Gasson, 2001
<b>geIE</b>	5min	94	35	94	1min	50	1min	72	1min	72	5min	Eaton e Gasson, 2001

T: Tempo; °C: Temperatura

#### 4.9 Análise estatística

A correlação entre suscetibilidade antimicrobiana apresentada pelas amostras de *Enterococcus* sp. resistentes e origem das coleta dos suabes retais dos macacos-prego foram analisados utilizando tabela cruzada com teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) ( $p \leq 0,05$ ) e teste exato de Fisher quando amostras pequenas ( $\leq 5$ ). Quando os dados apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ), foram analisados os resíduos, onde se os mesmos apresentassem  $\geq 2$  ou  $\leq -2$  confirmava a presença da diferença. Os dados foram analisados utilizando software IBM SPSS statistics versão 18.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados da distribuição de *Enterococcus* sp. isolados de amostras de fezes de macacos-prego

Em SSC foram isoladas 137 amostras de *Enterococcus* sp. oriundas de 11 origens: MP1, MP3 e MP4 foram coletadas de animais que defecaram nas gaiolas de apreensão individualmente; MP9, MP10, MP11, MP12, MP13, MP14 e MP15 foram coletadas com suabes estéreis individualmente dos animais; e MP17 foi coletada a partir de um *pool* de fezes dos animais que estavam em recuperação da anestesia.

Em SCS foram isoladas 86 amostras de *Enterococcus* sp. oriundas de 8 origens: MP21 e MP22 foram coletadas de animais que defecaram nas gaiolas de apreensão em grupo; MP24, MP25, MP26, MP27 e MP28 foram coletadas com suabes estéreis individualmente; e MP29 foi coletado a partir de um *pool* de fezes dos animais que estavam em recuperação da anestesia, que foram trazidos para a cidade Porto Alegre para completa recuperação.

Nas amostras ZOO foram isoladas 73 amostras de *Enterococcus* sp. oriundas de 5 origens: MP16, MP18, MP19 e MP20 foram coletadas de animais que defecaram nas gaiolas de apreensão individualmente; e MP30 foi coletada a partir de um *pool* de fezes do grupo de animais habitantes do zoológico.

Duzentos e noventa e seis isolados de *Enterococcus* sp. foram identificados nos três grupos trabalhados, sendo 137 de macacos de São Sebastião do Caí (SSC), 86 de Santa Cruz do Sul (SCS) e 73 de cativeiro (ZOO). As espécies mais encontradas foram *E. faecalis* (42,6 %; n = 126), seguido de *E. hirae* (29,4 %; n = 87) e *E. faecium* (15,5 %; n = 46). Diferenças na composição de *Enterococcus* sp. foram detectadas nos animais das três regiões, onde *E. faecalis* foi a espécie mais encontrada em SCS e *E. hirae* nas amostras de SSC e ZOO (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição de *Enterococcus* sp. isolados (%) de amostras de fezes de macaco-prego oriundos de três regiões diferentes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécie	Número (%) de isolados			
	SSC (n = 137)	SCS (n = 86)	ZOO (n = 73)	Total (%)
<i>E. faecalis</i>	44 (32,1)	77 (89,5)	5 (6,8)	126 (42,6)
<i>E. hirae</i>	49 (35,8)	2 (2,3)	36 (49,3)	87 (29,4)
<i>E. faecium</i>	26 (19,0)	2 (2,3)	18 (24,7)	46 (15,5)
<i>E. durans</i>	7 (5,1)	0 (0,0)	13 (17,8)	20 (6,8)
<i>E. casseliflavus</i>	9 (6,6)	4 (4,7)	0 (0,0)	13 (4,4)
<i>E. raffinosus</i>	1 (0,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,3)
<i>E. avium</i>	1 (0,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,3)
<i>E. gallinarum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	1 (0,3)
<i>Enterococcus</i> sp.	0 (0,0)	1 (1,2)	0 (0,0)	1 (0,3)
<b>Total</b>	<b>137 (100)</b>	<b>86 (100)</b>	<b>73 (100)</b>	<b>296 (100)</b>

SSC: São Sebastião do Caí; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul

## 5.2 Resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana

A porcentagem de suscetibilidade antimicrobiana reduzida detectada nos isolados de *Enterococcus* sp. pode ser visualizada na tabela 8. Cento e trinta e sete (46,3 %) apresentaram não suscetibilidade à rifampicina, 77 isolados à tetraciclina (26,0 %) e 66 isolados à eritromicina (22,3 %). Noventa e cinco (69,3 %) isolados de SSC apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado, 60 (69,7 %) em SCS e 44 (60,2 %) em ZOO (tabela 10). O perfil de múltipla resistência foi encontrado em 29 (21,2 %) isolados de *Enterococcus* sp. de SSC, 6 (6,9 %) em SCS e 8 (11 %) isolados em ZOO (Tabela 10). Para amostras não suscetíveis ou intermediárias à vancomicina e, foi aplicado teste MIC, ao qual todos os isolados de *Enterococcus* sp. apresentaram sensibilidade. Os isolados MP 14.1, 14.4, 14.5, 14.7, 14.8, 15.8, 15.9, 15.13, 16.2, 16.7, 16.13 e 17.2 apresentaram MIC 0,5 µg mL<sup>-1</sup>, MP 15.12, 18.7 e 19.10 MIC 1 µg mL<sup>-1</sup> e MP 15.4 MIC 2 µg mL<sup>-1</sup>.

SSC apresentou os maiores índices de não suscetibilidade quando se trata dos antibióticos tetraciclina (n = 54; 39,4 %), norfloxacin (n = 7; 5,1 %), e ampicilina (n = 1; 0,7 %). Os maiores índices de não suscetibilidade das amostras ZOO foram para os antibióticos nitrofurantoína (n = 25; 34,2 %),

eritromicina (n = 19; 26,0 %) e cloranfenicol (n = 1; 1,4%). E para as amostras SCS ciprofloxacina (n = 19; 22,1 %), sendo atribuído índices de suscetibilidade reduzida semelhantes para o antibiótico rifampicina nas regiões SSC (n = 70; 51,1%) e SCS (n = 44; 51,2%) (Tabela 8).

Dentre as espécies estudadas, *E. faecalis* apresentou os maiores resultados não suscetíveis (n = 87; 69,0 %), seguido de *E. faecium* (n = 34; 73,9 %) (Tabela 9). Cento e noventa e nove amostras (67,2 %) apresentaram suscetibilidade reduzida à antimicrobianos, destas 69,3 % (n = 95) referente às amostras SSC, 69,7 % (n = 60) SCS e 60,2 % (n = 44) ZOO (Tabela 9 e 10).



Tabela 8: Descrição das resistências dos isolados de *Enterococcus* sp. detectados em amostras de fezes de macaco-prego.

Antibiótico	Classificação	N isolados (%)			Total n (%)
		SSC (n=137)	SCS (n=86)	ZOO (n=73)	
Ampicilina	NS	1 (0,7)	0	0	1 (0,3)
	S	136 (99,3)	86 (100)	73 (100)	295 (99,7)
Ciprofloxacina	NS	27 (19,7)	19 (22,1)	7 (9,6)	53 (17,9)
	S	110 (80,3)	67 (77,9)	66 (90,4)	243 (82,1)
Cloranfenicol	NS	0	0	1 (1,4)	1 (0,3)
	S	137 (100)	86 (100)	72 (98,6)	295 (99,7)
Eritromicina	NS	32 (23,4)	15 (17,4)	19 (26,0)	66 (22,3)
	S	105 (76,6)	71 (82,6)	54 (74,0)	230 (77,7)
Estreptomicina	NS	0	0	0	0
	S	137 (100)	86 (100)	73 (100)	296 (100)
Gentamicina	NS	0	0	0	0
	S	137 (100)	86 (100)	73 (100)	296 (100)
Linezolida	NS	0	0	0	0
	S	137 (100)	86 (100)	73 (100)	296 (100)
Nitrofurantoína	NS	15 (10,9)	0	25 (34,2)	40 (13,5)
	S	122 (89,1)	86 (100)	48 (65,8)	256 (86,5)
Norfloxacina	NS	7 (5,1)	3 (3,5)	1 (1,4)	11 (3,7)
	S	130 (94,9)	83 (96,5)	72 (98,6)	285 (96,3)
Rifampicina	NS	70 (51,1)	44 (51,2)	23 (31,5)	137 (46,3)
	S	67 (48,9)	42 (48,8)	50 (68,5)	159 (53,7)
Tetraciclina	NS	54 (39,4)*	9 (10,5)	14 (19,2)	77 (26,0)
	S	83 (60,6)	77 (89,5)	59 (80,8)	219 (74,0)
Vancomicina	NS	0	0	0	0
	S	137 (100)	86 (100)	73 (100)	296 (100)

SSC: São Sebastião do Caí; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul  
 NS: Não suscetível (inclui resultados intermediários e resistentes no teste disco difusão); S: Suscetível;

\*Diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 9: Número (%) de isolados de *Enterococcus* sp. não suscetíveis detectados em amostras fecais e suabes retais de macaco-prego.

Espécie	Número (%) de isolados não suscetíveis			
	SSC	SCS	ZOO	Total <sup>a</sup> (%)
<i>E. faecalis</i>	26 (59,0)	56 (72,7)	5 (100)	87 (69,0)
<i>E. hirae</i>	31 (63,2)	Ausente	21 (58,3)	52 (59,7)
<i>E. faecium</i>	26 (100)	2 (100)	6 (33,3)	34 (73,9)
<i>E. durans</i>	7 (100)	Ausente	11 (84,6)	18 (90)
<i>E. casseliflavus</i>	5 (55,5)	2 (50)	Ausente	7 (53,8)
<i>E. raffinosus</i>	Ausente	Ausente	Ausente	0
<i>E. avium</i>	Ausente	Ausente	Ausente	0
<i>E. gallinarum</i>	Ausente	Ausente	1 (100)	1 (100)
<i>Enterococcus</i> sp.	Ausente	Ausente	Ausente	0
<b>Total</b>	<b>95 (69,3)<sup>b</sup></b>	<b>60 (69,7)<sup>b</sup></b>	<b>44 (60,2)<sup>b</sup></b>	<b>199 (67,2)</b>

SSC: São Sebastião do Cai; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul

<sup>a</sup>Total de espécies (%) de *Enterococcus* sp. não suscetíveis subdividido por cada região.

<sup>b</sup>Representatividade de amostras não suscetíveis de cada região em relação ao total de amostras resistentes.

Os fenótipos de resistência antimicrobiana que apareceram com maior frequência entre as amostras foram rifampicina (n = 52; 26,1 %), tetraciclina (n = 20; 10,1 %), associação rifampicina e tetraciclina (n = 15; 7,5 %) e nitrofurantoína (n = 13; 6,5 %) (Tabela 10).

Tabela 10: Número de isolados de *Enterococcus* sp. (%) por localidade, apresentando cada fenótipo de resistência antimicrobiana encontrados em amostras de fezes de macaco-prego.

Fenótipo de resistência antimicrobiana	<i>Enterococcus</i> sp. isolados por localidade (n de resistências por espécies)			Total de amostras por fenótipo (%)
	SSC	SCS	ZOO	
ERI		<i>E. faecalis</i> (5)		5 (2,5)
RIF	<i>E. faecalis</i> (12), <i>E. casseliflavus</i> (3), <i>E. hirae</i> (4), <i>E. durans</i> (3)	<i>E. faecalis</i> (22), <i>E. casseliflavus</i> (2)	<i>E. hirae</i> (3), <i>E. durans</i> (3)	52 (26,1)
TET	<i>E. faecium</i> (5), <i>E. hirae</i> (8)	<i>E. faecalis</i> (6)	<i>E. hirae</i> (1)	20 (10,1)
NIT			<i>E. hirae</i> (8); <i>E. durans</i> (4); <i>E. faecium</i> (1)	13 (6,5)
CIP		<i>E. faecalis</i> (2)		2 (1,0)
NOR		<i>E. faecalis</i> (1)		1 (0,5)
RIF/TET	<i>E. hirae</i> (11)		<i>E. faecalis</i> (3); <i>E. hirae</i> (1)	15 (7,5)
CLO/TET			<i>E. faecium</i> (1)	1 (0,5)
CIP/RIF	<i>E. faecalis</i> (3)	<i>E. faecalis</i> (9)		12 (6,0)
CIP/NOR			<i>E. gallinarum</i> (1)	1 (0,5)
CIP/ERI	<i>E. casseliflavus</i> (1)			1 (0,5)
CIP/TET	<i>E. faecium</i> (4)			4 (2,0)
ERI/NIT	<i>E. faecium</i> (1)		<i>E. hirae</i> (1)	2 (1,0)
ERI/RIF	<i>E. casseliflavus</i> (1); <i>E. faecium</i> (5)	<i>E. faecalis</i> (4)		10 (5,0)
ERI/TET	<i>E. hirae</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (1)	<i>E. hirae</i> (1); <i>E. faecium</i> (1)	4 (2,0)
NIT/RIF	<i>E. durans</i> (2)		<i>E. durans</i> (4), <i>E. faecium</i> (1); <i>E. hirae</i> (2)	9 (4,6)
NOR/RIF	<i>E. faecalis</i> (1)			1 (0,5)
AMP/NIT/RIF	<i>E. durans</i> (1)			1 (0,5)
ERI/RIF/TET	<i>E. hirae</i> (3), <i>E. faecalis</i> (1)			4 (2,0)

ERI/NIT/TET			<i>E. hirae</i> (1)	1 (0,5)
CIP/RIF/TET	<i>E. faecium</i> (1)	<i>E. faecium</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (1)	3 (1,5)
NIT/RIF/TET	<i>E. hirae</i> (4)			4 (2,0)
CIP/ERI/TET		<i>E. faecium</i> (1)		1 (0,5)
CIP/ERI/NIT			<i>E. hirae</i> (1)	1 (0,5)
CIP/ERI/RIF	<i>E. faecalis</i> (3)	<i>E. faecalis</i> (4)	<i>E. faecium</i> (1); <i>E. faecalis</i> (1)	9 (4,6)
CIP/NOR/RIF	<i>E. faecalis</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (2)		3 (1,5)
CIP/NIT/RIF			<i>E. hirae</i> (1)	1 (0,5)
ERI/NIT/NOR/TET	<i>E. faecium</i> (1)			1 (0,5)
ERI/NIT/RIF/TET	<i>E. durans</i> (1)		<i>E. hirae</i> (1)	2 (1,0)
CIP/ERI/NIT/TET	<i>E. faecium</i> (1)			1 (0,5)
CIP/ERI/NOR/TET	<i>E. faecium</i> (3)			3 (1,5)
CIP/ERI/RIF/TET	<i>E. faecium</i> (4); <i>E. faecalis</i> (2)		<i>E. faecium</i> (1)	7 (3,6)
CIP/ERI/NIT/RIF/TET	<i>E. faecium</i> (3)			3 (1,5)
CIP/ERI/NIT/NOR/RIF/TET	<i>E. faecium</i> (1)			1 (0,5)
<b>Total</b>	<b>95</b> <b>(69,3)<sup>a</sup></b>	<b>60</b> <b>(69,7)<sup>a</sup></b>	<b>44</b> <b>(60,2)<sup>a</sup></b>	<b>199</b> <b>(67,2)</b>

SSC: São Sebastião do Caí; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul  
 AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; LNZ: Linezolida; NIT: Nitrofurantoína; NOR: Norfloxacina.  
<sup>a</sup>Representatividade de resistências de cada região em relação ao total de amostras resistentes.

PMR: Perfil de múltipla resistência

### 5.3 Resultados da detecção dos genes relacionados à resistência e virulência

Em relação à presença de genes relacionados à resistência em enterococos, as amostras ZOO apresentaram maiores índices para *msrC* (18/22; 81,8 %), *gyrA* (17/28; 60,7 %) e *tetL* (8/18; 44,4 %) (Tabela 11). Para o gene *tetM* os isolados de SCS apresentaram maior frequência (9/9; 100 %). Para os genes relacionados à virulência, as amostras SSC e SCS apresentaram as maiores porcentagens para o gene *gelE* (19/19 e 13/13; 100 %). Para *esp* (3/86; 3,5 %), *ace* (80/86; 93,0 %) e *agg* (9/86; 10,5 %), as amostras SCS apresentaram as maiores porcentagens (Tabela 11). No geral, o

gene de resistência mais prevalente entre as amostras foi *tetM* (67/83; 80,7 %); e gene de virulência mais presente destacou-se *ace* com 129 (43,6 %) positivos, em relação às 296 amostras testadas (Tabela 11 e 12).

Tabela 11: Número de isolados de *Enterococcus* sp. (%) com presença de genes relacionados à resistência e virulência em amostras de fezes de macaco-prego.

Amostras	Genes de resistência (%)						Genes de virulência (%)				
	<i>msrC</i> *	<i>ermB</i> *	<i>gyrA</i> *	<i>tetL</i> *	<i>tetM</i> *	<i>tetS</i> *	<i>gelE</i> *	<i>cyIA</i> *	<i>esp</i>	<i>ace</i>	<i>agg</i>
SSC	14/55 (25,5)	0/55 (0,0)	23/56 (41,1)	15/56 (26,8)	45/56 (80,4)	0/56 (0,0)	19/19 (100)	0/32 (0,0)	0/137 (0,0)	41/137 (29,9)	2/137 (1,5)
SCS	2/21 (9,5)	0/21 (0,0)	6/47 (12,8)	1/9 (11,1)	9/9 (100)	0/9 (0,0)	13/13 (100)	0/9 (0,0)	3/86 (3,5)	80/86 (93,0)	9/86 (10,5)
ZOO	18/22 (81,8)	0/22 (0,0)	17/28 (60,7)	8/18 (44,4)	13/18 (72,2)	0/18 (0,0)	0/0 (0,0)	0/3 (0,0)	1/73 (1,4)	8/73 (10,9)	0/73 (0,0)
<b>Total</b>	<b>34/98 (34,7)</b>	<b>0/98 (0,0)</b>	<b>46/131 (35,1)</b>	<b>24/83 (28,9)</b>	<b>67/83 (80,7)</b>	<b>0/83 (0,0)</b>	<b>32/32 (100)</b>	<b>0/44 (0,0)</b>	<b>4/296 (1,4)</b>	<b>129/296 (43,6)</b>	<b>11/296 (3,7)</b>

\*Pesquisado somente em amostras que apresentaram teste fenotípico positivo

SSC: São Sebastião do Cai; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul.

Fazendo uma comparação dentre as espécies de *Enterococcus* sp. encontradas, *E. faecium* apresentou maior frequência do gene *msrC* (25/31; 80,6 %), seguido por *E. hirae* que destacou-se por apresentar maior frequência para os genes *gyrA* (25/27; 92,6 %) e *tetL* (19/37; 51,4 %). Para *tetM*, *E. faecalis* apresentou maior frequência (14/15; 93,3 %) (Tabela 12). Em relação aos genes de virulência, *E. faecalis* foi a espécie que apresentou os maiores índices para a maioria dos genes analisados, possuindo maior frequência para os genes *gelE* (32/32; 100 %), *ace* (110/126; 87,3 %) e *agg* (11/126; 8,7 %) (Tabela 12). *E. gallinarum* apresentou maior índice para *esp* (1/1; 100 %). *E. raffinosus* e *E. avium* e *Enterococcus* sp. não apresentaram genes de resistência nem virulência.

Tabela 12: Número de isolados de *Enterococcus* sp. (%) com presença de genes relacionados à resistência e virulência em amostras de fezes de macaco-prego.

Espécies	Genes de resistência (%)							Genes de virulência (%)					
	<i>msrC</i> *	<i>ermB</i> *	<i>gyrA</i> *	<i>tetL</i> *	<i>tetM</i> *	<i>tetS</i> *	Total	<i>geE</i> *	<i>cyIA</i> *	<i>esp</i>	<i>ace</i>	<i>agg</i>	Total
<i>E. faecalis</i>	1/31 (3,2)	0/31 (0,0)	5/63 (7,9)	2/15 (13,3)	14/15 (93,3)	0/15 (0,0)	<b>22</b> <b>(12,9)</b>	32/32 (100)	0/8 (0,0)	3/126 (2,4)	110/126 (87,3)	11/126 (8,7)	<b>156</b> <b>(88,6)</b>
<i>E. hirae</i>	7/28 (25)	0/28 (0,0)	25/27 (92,6)	19/37 (51,4)	32/37 (86,5)	0/37 (0,0)	<b>83</b> <b>(48,5)</b>	0/0 (0,0)	0/17 (0,0)	0/87 (0,0)	7/87 (8,0)	0/87 (0,0)	<b>7</b> <b>(4,0)</b>
<i>E. faecium</i>	25/31 (80,6)	0/31 (0,0)	10/33 (30,3)	3/28 (10,7)	21/28 (75)	0/28 (0,0)	<b>59</b> <b>(34,5)</b>	0/0 (0,0)	0/7 (0,0)	0/46 (0,0)	2/46 (4,3)	0/46 (0,0)	<b>2</b> <b>(1,1)</b>
<i>E. durans</i>	1/6 (16,7)	0/6 (0,0)	5/5 (100)	0/3 (0,0)	0/3 (0,0)	0/3 (0,0)	<b>6</b> <b>(3,5)</b>	0/0 (0,0)	0/2 (0,0)	0/20 (0,0)	3/20 (15)	0/20 (0,0)	<b>3</b> <b>(1,7)</b>
<i>E. casseliflavus</i>	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>	0/0 (0,0)	0/7 (0,0)	0/13 (0,0)	7/13 (53,8)	0/13 (0,0)	<b>7</b> <b>(4,0)</b>
<i>E. raffinosus</i>	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>
<i>E. avium</i>	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>
<i>E. gallinarum</i>	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	1/1 (100)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	<b>1</b> <b>(0,6)</b>	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	1/1 (100)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	<b>1</b> <b>(0,6)</b>
<i>Enterococcus</i> sp.	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	<b>0</b> <b>(0,0)</b>
<b>Total</b>	<b>34/98</b> <b>(34,7)<sup>a</sup></b>	<b>0/98</b> <b>(0,0)<sup>a</sup></b>	<b>46/131</b> <b>(35,1)<sup>a</sup></b>	<b>24/83</b> <b>(28,9)<sup>a</sup></b>	<b>67/83</b> <b>(80,7)<sup>a</sup></b>	<b>0/83</b> <b>(0,0)<sup>a</sup></b>	<b>171</b> <b>(100)</b>	<b>32/32</b> <b>(100)<sup>b</sup></b>	<b>0/44</b> <b>(0,0)<sup>b</sup></b>	<b>4/296</b> <b>(1,4)<sup>b</sup></b>	<b>129/296</b> <b>(43,6)<sup>b</sup></b>	<b>11/296</b> <b>(3,7)<sup>b</sup></b>	<b>176</b> <b>(100)</b>

\*Pesquisado somente em amostras que apresentaram teste fenotípico positivo

SSC: São Sebastião do Caí; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul.

<sup>a</sup>Número de amostras positivas para o gene / número de amostras testadas para o gene (porcentagem em relação ao número total de genes de resistência positivos)

<sup>b</sup>Número de amostras positivas para o gene / número de amostras testadas para o gene (porcentagem em relação ao número total de genes de virulência positivos)

Comparando os genótipos e fenótipos para gelatinase e citolisina, SCS apresentou 15,1 % (13/86) de presença para gelatinase e SSC 13,9 % (19/137). Todas as amostras testadas apresentaram positividade para gene *geE*. Para o teste fenotípico para citolisina, SSC apresentou 32 presenças das 137 amostras testadas (23,4 %), SCS 9 presenças das 86 amostras testadas (10,5 %) e ZOO três das 73 testadas (4,1 %). Nenhuma amostra testada apresentou positividade para o gene *cyIA* (Tabela 13).

Tabela 13: Número de isolados de *Enterococcus* sp. (%) com positividade em testes fenotípicos e genotípicos relacionados à virulência em amostras de fezes de macaco-prego.

Local de coleta	Fenótipos e genótipos encontrados n (%)			
	Gelatinase <sup>a</sup>	<i>ge/E</i> <sup>b</sup>	Citolisina <sup>a</sup>	<i>cy/A</i> <sup>b</sup>
SSC	19/137 (13,9)	19/19 (100)	32/137 (23,4)	0/32 (0,0)
SCS	13/86 (15,1)	13/13 (100)	9/86 (10,5)	0/9 (0,0)
ZOO	0/73 (0,0)	0/0 (0,0)	3/73 (4,1)	0/3 (0,0)
<b>Total</b>	<b>32/296 (10,8)</b>	<b>32/32 (100)</b>	<b>44/296 (14,9)</b>	<b>0/44 (0,0)</b>

SSC: São Sebastião do Caí; SCS: Santa Cruz do Sul; ZOO: Zoológico de Sapucaia do Sul.

<sup>a</sup> Fenótipos positivos / fenótipos testados

<sup>b</sup> Genótipos positivos / genótipos testados

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Distribuição de *Enterococcus* sp. isolados de amostras de fezes de macacos-prego

Foi possível detectar a presença do gênero *Enterococcus* em todas as amostras fecais e suabes retais dos macacos-prego pesquisados. Esses achados corroboram com a elevada presença deste gênero na microbiota gastrointestinal de mamíferos (Devriese et al., 2006; Lebreton et al., 2014). Dentre os três grupos de amostras analisadas, foi observada uma divergência entre a composição de espécies bacterianas encontradas. Nas amostras de SCS a espécie mais prevalente foi *E. faecalis* (89,5 %), enquanto nas amostras de ZOO e SSC a espécie mais detectada foi *E. hirae* (49,3 % e 35,8 % respectivamente). Devriese et al. (1987) encontraram no intestino de mamíferos as espécies *E. faecalis* e *E. hirae* com maior frequência. Poeta et al. (2005) ao pesquisar a diversidade de enterococos em animais selvagens, encontrou 52,1 % *E. faecalis* e 10 % *E. hirae*, confirmando a presença das espécies em animais selvagens.

Xavier et al. (2010) ao pesquisar enterococos em primatas oriundos

do Centro de Primatas da Universidade de Brasília constatou 12,3 % de presença de *E. faecalis*. Segundo os autores, os macacos eram alimentados com frutas tropicais, vegetais e ração de gato, o que pode corroborar com os resultados do presente trabalho, onde os animais de SCS, que recebem alimentação mais diversificada, apresentaram maior frequência desta mesma espécie em questão. Em amostras fecais de lince ibérico (*L. pardinus*), *E. hirae* foi uma das espécies mais prevalentes encontradas (11 isolados) (Gonçalves et al., 2013), reafirmando sua presença na microbiota intestinal de mamíferos selvagens.

*Sapajus nigritus* por ser considerada uma espécie onívora, torna sua fonte de alimentação muito diversificada. Mundt (1962) obteve cepas de *Enterococcus* spp. à partir de flores dos gêneros *Trisetum*, *Lobelia* e *Senecio*, os quais também ocorrem no Brasil (Reflora – Flora do Brasil, 2018), podendo estimar desta forma que a alimentação vegetal pode ser fonte direta bacteriana. Também é possível inferir que enterococos encontrados nas fezes dos macacos podem ser provenientes em grande parte por sua dieta. Ainda, o mesmo autor encontrou enterococos em fontes diversificadas como amostras de água, superfície de solo, plantas aquáticas, fungos e folhas de samambaia (Mundt, 1962). Essa diversidade de habitats apresentada pela colonização dos enterococos pode ser explicada por sua resistência às condições adversas, como diferentes temperaturas (10-45°C), hiperosmolaridade (6,5 % NaCl) (Sherman, 1937), assim como aos agentes físicos, como radiação UV (Hartke et al., 1998).

Martin e Mundt (1972) mostraram que uma grande variedade de insetos possui papel crucial na distribuição de enterococos em plantas. *E. faecalis* (32 %), *E. faecium* (22,4 %) e *E. casseliflavus* (43,5 %) foram associados a 37 diferentes táxons de insetos. Shil et al. (2014) identificaram *E. faecalis*, *E. durans* e *E. casseliflavus* dentre outras espécies bacterianas em intestinos de ninfas e pupas de três espécies de insetos diferentes. Com isso, pode-se estimar que insetos possam servir como reservatórios e vetores de enterococos, bem como abrigar genes de resistência e/ou virulência. Como insetos servem de alimentos para *S. nigritus*, sua ingestão pode estar



propiciando uma variabilidade genética dentre a microbiota do mesmo, corroborando com os achados do presente trabalho e salientando desta forma a importância do estudo do processo de cadeia alimentar na aquisição bacteriana e genética.

Lebreton et al. (2014) através de um dendograma classificou espécies de enterococos de acordo com sua distribuição na natureza. As espécies *E. raffinosus*, *E. avium* e *E. gallinarum* foram descritas em infecções ou colonizações humanas. *Enterococcus avium* foi descrita também em insetos, répteis, aves, mamíferos e água. Já *E. gallinarum* além dos grupos citados, foi encontrada também em plantas, solo e comida. O fato de ter encontrado presença de *E. raffinosus* somente em um isolado de *Enterococcus* sp. de SSC, pode ser explicado em razão da proximidade do bando de macacos ao hospital da cidade, local onde espécies bacterianas patogênicas são encontradas com mais facilidade.

Mundt (1962) inoculou culturas de *E. faecalis* em sementes de cinco plantas diferentes. Após cultivo, conseguiu recuperar a bactéria em estudo em todas as partes da planta estudada, incluindo no solo, raiz, arilo, haste, cotilédone e folhas. Portanto, pode-se estimar que frutos, os quais também fazem parte da alimentação dos macacos, podem possuir enterococos desde a fase de germinação, mais especificamente na semente propriamente dita. O micro-organismo acaba por se manter presente em todos os estágios de desenvolvimento da planta, sobrevivendo às condições mais adversas do meio ambiente. Com isso, pode-se aferir que compartilhar um habitat é um importante fator de risco para disseminação de enterococos.

## 6.2 Suscetibilidade antimicrobiana e genes de resistência presentes em *Enterococcus* sp. isolados de fezes de macacos-prego

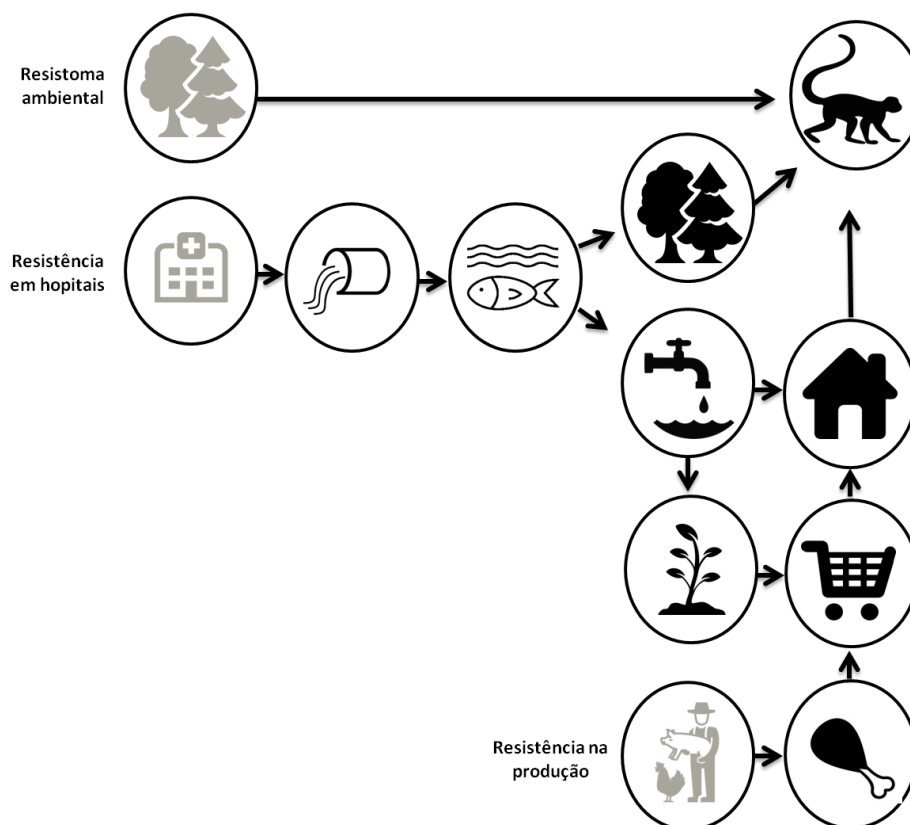
Dentre os antibióticos testados frente às amostras de enterococos isoladas de fezes de macacos-prego, rifampicina (46,3 %), tetraciclina (26,0 %) e eritromicina (22,3 %) apresentaram os maiores índices de não suscetibilidade. De acordo com os testes estatísticos aplicados, as amostras

SSC diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), das amostras dos demais grupos, demonstrando resíduos ajustados superiores para o antibiótico tetraciclina. A proximidade ao ambiente hospitalar apresentada pela origem das amostras, somada a excreção e incompleta metabolização de antibióticos por humanos e animais é uma das principais fontes de disseminação de resistência antibacteriana. Brown e colaboradores (2006) analisaram a presença de antibióticos em efluentes hospitalares, onde dos seis antibióticos testados, todos eles se mostraram presentes em pelo menos uma das amostras coletadas. Desta forma, os autores concluíram que hospitais tendem a serem os principais contribuintes para a presença de antibióticos em águas residuais (Figura 2). Os hospitais poluídos com antibióticos são “zonas de guerra”, no qual ocorre uma luta contínua entre micro-organismos infecciosos e pacientes, onde profissionais da saúde tentam intervir com forças de paz (Wright, 2007).

Xu e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparativo em água de diferentes etapas de estação de tratamento, onde verificaram que tanto genes de resistência a antibióticos como a própria droga foram frequentemente encontrados, reiterando que a descarga de antibióticos através de efluentes no meio ambiente pode levar a uma pressão seletiva para a ocorrência de resistência antimicrobiana. Rodríguez-Mozaz et al. (2014) encontraram em efluentes hospitalares altas concentrações da classe fluoroquinolonas, juntamente aos genes relacionados à resistência a tetraciclina (*tetW*), macrolídeos (*ermB*) e sulfonamidas (*sulI*). Esse problema se agrava em casos onde rios são as principais fontes de água para o consumo humano (Figura 2).

Estudos relacionados ao papel do descarte errôneo de antibióticos no meio ambiente são infrequentes. Na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, foram realizados dois estudos de caso onde foram analisadas a presença de bactérias resistentes aos antibióticos na Baía de Guanabara e Lago Jacarepaguá.

Figura 2: Teoria de redes (*network theory*) de potenciais inter-relações epidemiológicas do movimento da resistência antimicrobiana, dentre as populações de macacos-prego das regiões de São Sebastião do Caí e Santa Cruz do Sul.



Fonte: O autor

Em ambos os locais foram encontradas bactérias multirresistentes, onde na primeira foram encontradas resistências relacionadas à ampicilina, tetraciclina e kanamicina; e no segundo local a bactéria *E. gallinarum* também possuindo perfil de multirresistência (Coutinho et al., 2013). Na mesma cidade, foi constatada resistência a todos os antibióticos testados, quando realizado cultivo bacteriano em águas residuais de um hospital. Estudos como esse corroboram aos achados do presente trabalho, onde demonstram que o impacto antropogênico pode promover a resistência bacteriana no ambiente.

Por alterarem principalmente as formas de vida microscópicas, como as bactérias, as consequências da contaminação do ambiente por antibióticos têm recebido menos atenção, passando muitas vezes despercebidas (Martinez,

2009). O problema da falta de tratamento de águas residuais hospitalares no Brasil, em razão de regulamentos sanitários precários, acabam por selecionarem cada vez mais bactérias resistentes no meio ambiente (Picão et al., 2013). Vive-se em um momento cuja evolução e a disseminação da resistência antimicrobiana não são acompanhadas pelo desenvolvimento de novas drogas. Somado ao fato de que o controle da disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos é absolutamente necessário, regulamentações hospitalares de tratamento de esgotos quanto à disseminação de bactérias e / ou genes de resistência poderiam contribuir para desacelerar a evolução da resistência antimicrobiana para além dos hospitais (Picão et al., 2013) (Figura 2).

Rifampicina tem sido utilizada no tratamento da tuberculose (Goldstein, 2014) e pouco associada ao tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* sp. Uma das hipóteses que pode justificar a elevada presença de resistência a este antimicrobiano (46,3 %) seria a exposição da bactéria frente a este composto, durante tratamento de infecções causadas por bactérias não-comensais em razão da pressão seletiva exercida (Kristich *et al.*, 2014). Através deste estímulo causado pela presença da droga no ambiente, a bactéria pode desenvolver resistência através de mutações. Estes ainda podem ser associados também a para resistência a desinfetantes e / ou metais pesados (Gillings e Stokes, 2012).

No Brasil, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), existem alguns aditivos alimentares que possuem seu uso liberado em produtos destinados aos animais (bacitracina, colistina, clorexidina dentre outros). Esses animais que recebem tais aditivos servem de alimento para os seres humanos e, até mesmo, para outros animais, fazendo com que sejam ingeridos indiretamente traços da droga, pela incompleta metabolização da mesma (Brown et al., 2006). Ao serem alimentados por comida industrializada, os macacos estão adquirindo os mesmos genes e resistências que os humanos, os quais mais tarde serão defecados e estarão presente no meio ambiente (Figura 2).

Recente trabalho realizado por Costa (2018) analisou a presença de

resistências em amostras de *Enterococcus* sp. isolados de guano de morcegos selvagens no sul do Brasil. Nele foi constatado que rifampicina apresentou os maiores índices de resistência (72,6 %), seguido por eritromicina (43,83 %). Esses achados corroboram ao presente estudo, onde as amostras de SSC e SCS também demonstraram maiores índices de resistência à rifampicina (51,1 % e 51,2 %). A proximidade dos morcegos em relação às resistências encontradas foi sustentada pela ideia de estarem mais próximos a locais urbanizados, comparados aos demais testados.

Tetraciclina uma classe de antibióticos que também demonstrou isolados com não suscetibilidade (26,0 %). Este dado pode ser explicado em razão das tetraciclinas se manterem estáveis no meio ambiente e não serem tipicamente degradadas como a maioria dos antibióticos (Rudra et al., 2018). São consideradas poluentes modernos (Dizavandi et al., 2016), uma vez que podem ser encontradas em solos e meio aquático (Gothwal e Shashidhar, 2014). As tetraciclinas são utilizadas para tratamento de infecções em animais e seres humanos por serem drogas de amplo espectro. Apresentam atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, além de organismos atípicos como clamídias, micoplasmas e rickettsias e parasitas protozoários, o que corrobora seu valor no tratamento de infecções (Chopra e Roberts, 2001). No Brasil, o uso das tetraciclinas como aditivos zootécnicos foi proibido somente no ano de 2009 (Brasil, Instrução Normativa 26/2009), sendo que a prática do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento data meados de 1950 (Fernandez et al., 1973). Podemos estimar desta forma que o uso de antibióticos como promotores de crescimento no Brasil levou quase 60 anos para ser impedido, acumulando muitas resistências, sendo refletidas até os dias de hoje.

Assim como Furness e colaboradores (2017) estimaram o papel de bioindicadores a pequenos mamíferos através da presença de *Escherichia coli* resistente a antibióticos; pode-se inferir que a presença de genes e resistências nos macacos do Brasil possam caracterizá-los com a função de sentinelas na distribuição de enterococos na natureza. Não obstante, ecossistemas naturais são *hotspots* de mecanismos de resistência, devido à grande diversidade

genética encontrada entre micro-organismos de vida livre (Coutinho et al., 2013).

Por outro lado, a resistência pode surgir também em ambientes sem pressão seletiva a antibióticos, em razão de que algumas bactérias possuem papel funcional como produtores de antibióticos. Além disso, a resistência pode ser intrínseca em algumas espécies bacterianas (Stewart et al., 2014; Wright, 2007). Há relatos da presença de resistência em bactérias do solo, independentes de atividade humana (Allen et al., 2010). Com isso, não podemos excluir a possibilidade de que a resistência encontrada nos macacos pode ser derivada do próprio ambiente (Figura 2).

Os genes de resistência mais encontrados dentre as amostras de fezes oriundas de macacos-prego foram *tetM* (80,7 %), seguido por *gyrA* (35,1 %) e *msrC* (34,7 %). Poeta et al. (2005) também encontrou o gene *tetM* em maior prevalência em amostras de enterococos oriundos de animais selvagens em Portugal. Prichula et al. (2016) ao estudar o mesmo gênero bacteriano em amostras de animais marinhos selvagens identificou o gene *tetM* em maior prevalência (73,07 %), e o gene *msrC* em 60,15 % dos isolados de *Enterococcus* sp., corroborando aos achados do presente trabalho, onde *tetM* foi encontrado em maior prevalência e *msrC* em menor. Cinquenta por cento das amostras isoladas a partir de duas espécies de lobos marinhos do sul do Brasil apresentaram gene *tetM* (Santestevan et al., 2015). Os genes *tet* são comumente encontrados numa vasta gama de gêneros bacterianos, isolados de humanos, animais e meio ambiente, e podem estar associados a elementos móveis ou conjugativos (Chopra e Roberts, 2001). O gene *tetM* por ser associado ao transposon conjugativo Tn916-Tn1545 o torna muito presente no mundo bacteriano, uma vez que este elemento é considerado altamente onipresente (Clewell et al., 1995). O fato deste gene estar associado a este plasmídeo, o qual é considerado promíscuo dentre os gêneros bacterianos, pode explicar sua elevada presença entre as amostras fecais de macacos-prego.

A presença de *gyrA*, que é conferido através de uma mutação nas subunidades da girase (Murray, 1990), foi detectado em 35,1 % das amostras

de macaco-prego analisadas. Petersen e Jensen (2004) detectaram a presença da mutação *gyrA* tanto em enterococos ambientais como clínicos. Desta forma pode-se estimar que exista pressão seletiva às quinolonas no meio ambiente, através da presença da droga. No presente trabalho, somente 46 das 131 amostras resistentes ou intermediárias para as fluoroquinolonas utilizadas foram positivas para o gene *gyrA*. Resultado semelhante foi encontrado por Demirgül e Tuncer (2017) onde detectaram este mesmo gene em apenas uma cepa das 23 com perfil fenotípico resistente para ciprofloxacina e Jahan et al. (2013) não detectaram o gene *gyrA* quando analisados três isolados resistentes à ciprofloxacina. Este fato pode ter ocorrido nos três trabalhos em razão da ocorrência de mutação em algum outro gene relacionado à resistência à fluoroquinolonas que não pesquisado no trabalho, como *parC* (López et al., 2011).

O gene responsável pelo efluxo de eritromicina em enterococos (*msrC*) foi detectado em 34,7 % dos 98 isolados pesquisados. Portillo et al. (2000) sugeriram que o gene *msrC* era espécie-específico para *E. faecium*. Porém, assim como Molale e Bezuidenhout (2016). Apesar deste gene ser mais encontrado em *E. faecium* no presente trabalho, foi encontrado também nas espécies *E. faecalis*, *E. hirae* e *E. durans*. Sugere-se que a presença do gene em outras espécies de enterococos pode representar a aquisição genética horizontal entre espécies sugerindo a mobilidade deste gene (Thumu e Halami, 2012). Poucos estudos relatam a presença do gene *mrsC* em enterococos ambientais. Como já citado, trabalho de Prichula et al. (2016) relatou 60,15 % de presença do gene em suas amostras de animais selvagens, o que corrobora aos achados do presente trabalho, onde foi encontrado o gene em isolados selvagens.

*Enterococcus hirae* foi a espécie que apresentou maior quantidade de genes de resistência (48,5 %). Informações genéticas e a descrição do perfil de resistência sobre esta espécie são limitadas (Peng et al., 2017), sendo que somente nos últimos anos vem sendo reportados trabalhos sobre infecções graves e fatais em humanos (Alfouzan et al., 2014; Dicipinigaitis et al., 2015; Pãosinho et al., 2016). Com base nesta carência de dados, Peng et al. (2017)

realizaram um mapeamento do genoma de uma cepa de *E. hirae* isolada de amostras de alimento. O genoma desta espécie não só apresentou genes de resistência a antibióticos, mas também plasticidade genômica mediada por elementos de transposição móveis independentes, como transposases, repetições *tandem* e plasmídeo pRZ1. Essas características podem apoiar a adaptação a novos nichos ambientais, sendo necessários novos estudos a fim de atentar a esta cepa como possível mediadora de resistência. Por outro lado, a presença de 34,5 % de genes de resistência em *E. faecium* é um resultado não inesperado no presente trabalho, uma vez que esta espécie é amplamente associada às infecções nosocomiais (Werner et al., 2008), sendo a multirresistência aos antibióticos uma das mais notáveis características da espécie (Willems e Bonten, 2007).

Como o habitat natural de primatas não humanos são florestas tropicais, a maioria das interações entre humanos e primatas ocorre nessa interface de alto risco, que tem aumentado devido ao ecoturismo, expandindo à invasão de florestas, como no caso dos macacos de SCS. Essas interações podem levar à troca de patógenos através de várias rotas de transmissão (Wolfe et al., 1998), como contatos através do oferecimento de alimentação humana, o que pôde ser observado nos animais de SSC e SCS. Ainda, a fragmentação florestal dita como urbanização por Hassel et al. (2016) pode apresentar efeitos importantes, tanto para a conservação da vida selvagem como para a saúde pública. Os mesmos autores citam a teoria de redes (*network theory*), que tenta inter-relacionar epidemiologicamente os potenciais de transmissão de patógenos dentro de populações (Figura 2). Glover (2014) ao comparar macacos frente a três níveis de contato humano constatou que, quanto mais próximo o animal se encontrava do ser humano, mais resistências ele possuía. Fato também observado no trabalho de Rolland et al. (1985), onde babuíños que se alimentavam de detritos humanos mantiveram um valor elevado de resistência antimicrobiana no intestino. Não obstante, o ecossistema intestinal é local onde podem ocorrer trocas genéticas entre bactérias. Em razão de ser um local de suprimento nutricional contínuo e elevada diversidade bacteriana, torna o intestino fonte potencial de infecções



patogênicas (Licht e Wilcks, 2005).

Tirando como base que o uso de antibióticos aumentou 36 % em dez anos (de 54.083.964,813 unidades padrão em 2000 para 73.620.748,816 unidades padrão em 2010) (Boeckel et al., 2014), a resistência passou a ser tratada não apenas como uma questão médica, mas também como uma questão ecológica (Coutinho et al., 2013). Uma baixa concentração (subinibitória) de antibióticos não faz com que ocorra a antibiose, porém este tipo de tratamento afeta os níveis de expressão gênica (Davies, 2006).

Através do monitoramento da prevalência de resistência em bactérias indicadoras, como o *Enterococcus*, comparado a diferentes nichos (animais, pacientes e humanos saudáveis), faz possível a realização de uma dedução em relação à transferência de bactérias resistentes ou genes de resistência de animais para humanos e vice-versa (Martel et al., 2001; Radhouani et al., 2014). A *World Health Organization* (WHO) recomenda que agricultores e a indústria alimentícia cessem o uso de antibióticos rotineiramente para promover o crescimento e prevenir doenças em animais saudáveis, a fim de ajudar a preservar a eficácia dos antibióticos para uso terapêutico. Em alguns países aproximadamente 80 % do consumo total de antibióticos medicamentosos está situado no setor animal, principalmente para a promoção do crescimento em animais saudáveis (WHO, 2017).

### 6.3 Determinantes de virulência presentes em *Enterococcus* sp. isolados de fezes de macacos-prego

Fatores de virulência contribuem para o condicionamento e persistência do patógeno no hospedeiro (Soares et al., 2014). *Enterococcus faecalis* foi a espécie que apresentou maiores quantidades de genes de virulência pesquisados (88,6 %), comparando com as demais espécies. Eaton e Gasson (2001) também encontraram em *E. faecalis* os maiores determinantes de resistência em seu trabalho. *E. faecalis* tem por característica ser a espécie mais patogênica dos enterococos. O fato de ter encontrado os maiores índices de presença para os genes *gelE*, *esp*, *ace* e *agg*, suportam o

fato de estarem mais frequentes nesta espécie, juntamente a seu papel na patogenicidade.

O gene *geE* foi encontrado em todos os isolados de *Enterococcus* sp. que apresentaram teste fenotípico positivo. Assim como Poeta et al. (2005), 75,3 % das amostras fecais de animais selvagens de Portugal que apresentaram o gene eram da espécie *E. faecalis*. Achados que corroboram ao presente estudo, onde 100 % dos isolados pesquisados para o gene se apresentaram como *E. faecalis*. Porém, de todas as amostras testadas, apenas 10,8 % foram positivas tanto para teste fenotípico como genotípico. No trabalho de Soares et al. (2014) 62,5 % das amostras de enterococos que apresentaram positividade para *geE*, eram também formadoras de biofilme. As amostras eram oriundas de isolados clínicos, onde explicou que em função da degradação de colágeno e outras proteínas serem extremamente relevantes para invasão da cepa, pode desta forma explicar a associação entre isolados invasivos e gene *geE* positivo.

Nenhum dos *Enterococcus* sp. isolados produtores de citolisina apresentaram o gene *cyIA*. Este fato também foi obtido no trabalho de Fujimoto (2011) onde 14 isolados de *Enterococcus* sp. apresentaram atividade beta-hemolítica positiva, porém genes *cyIA*, *cyIB* e *cyIM* negativos. De Vuyst et al. (2003) também presenciaram este fato em seu trabalho, onde cinco cepas de enterococos apresentaram beta-hemólise positiva e *cyL<sub>L</sub>* e *cyL<sub>S</sub>* negativos. Os autores explicaram este fato através da ocorrência de outro provável componente citotóxico apresentado nas cepas, responsável por esta mesma atividade. Um efeito citotóxico adicional em *Enterococcus* foi apresentado por Moy et al. (2004) onde provaram através de cepas mutantes de *E. faecium* a produção de altas concentrações de peróxido de hidrogênio nas células, o qual causou danos celulares ao nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Esta poderia ser uma explicação dada aos achados do presente trabalho.

A presença do gene *esp* em amostras presume a capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas (Toledo-Arana et al., 2001). No presente trabalho, foi encontrada baixa frequência deste gene, resultando na sua detecção em apenas 1,4 % das amostras. Utilizando como base o estudo

de Scott e colaboradores (2005) onde associaram a presença do gene *esp* à poluição fecal humana no ambiente, a baixa frequência encontrada para este gene faz constatar a ausência deste tipo de contaminante no meio onde os macacos vivem. Trabalhos mostram que o gene *esp* é frequentemente associado a amostras clínicas (Billström et al., 2008; Fisher e Phillips, 2009). Porém Drahovská et al. (2004) encontraram este gene em amostras de queijo, o que suporta os achados do presente trabalho em *Enterococcus* sp. isolados provenientes de SCS, local onde os macacos recebem alimentação industrializada em maior quantidade quando relacionados aos outros locais de coleta. Abriouel et al. (2008) encontraram o gene *esp* em maior prevalência nas amostras clínicas (87,18 %), quando comparadas à água (33,33 %) e aos vegetais (23,5 %). Os autores explicaram estas variações em razão da presença do gene não ser muito útil em ambientes não humanos, uma vez que o gene é importante para adesão em tecidos humanos, principalmente no trato urinário.

Assim como trabalhos de Santestevan et al. (2015) e Costa (2018), os quais encontraram 93,8 % e 91,8 % de presenças do gene *ace* em animais selvagens, o presente estudo também apresentou grande frequência (43,6 %) do gene em amostras de macacos-prego. Adesina ao colágeno (Ace) é responsável pela colonização em tecidos, sendo considerado evento primordial na patogenidade bacteriana e conseqüentemente, na virulência (Patti et al., 1994). Xavier et al. (2010) encontraram 100 % e 87,5 % dos genes *ace* e *esp* respectivamente, em isolados de enterococos provenientes de amostras fecais de macacos no Brasil. Os autores afirmam que os primatas além de possuírem características de virulência, tem capacidade de disseminar suas linhagens bacterianas entre diferentes indivíduos.

Para o gene *agg*, somente 3,7 % das amostras de enterococos se apresentaram positivas, sendo a maior parte delas proveniente da coleta de SCS. A maioria dos trabalhos publicados em relação a genes de virulência é relacionada à parte clínica (Furumura et al., 2006; Thurlow et al., 2010; Nallapareddy et al., 2011; Soares et al., 2014). Apesar disto, Mus et al. (2017) encontraram 4,6 % de presença de gene *agg* em amostras oriundas de

alimentos de origem animal na Turquia. Os autores observaram que alimentos também podem ser considerados reservatórios de genes de virulência para enterococos. O fato da maioria dos resultados estarem relacionado aos *Enterococcus* sp. isolados provenientes das amostras SCS, faz pensar que o alimento industrializado que os macacos recebem pode ser considerado fonte de genes tanto de virulência como resistência. No trabalho, uma grande porção das amostras que apresentaram o gene *ace*, possuíram o gene *agg* concomitantemente. Este fato pode ser explicado através da co-seleção, onde um plasmídeo pode apresentar múltiplos genes de virulência.

#### 6.4 Medidas de mitigação, remediação e prevenção da resistência e virulência bacteriana em meio ambiente antropogênico

Através dos resultados obtidos no trabalho, pôde-se inferir o papel dos macacos-prego como sentinelas na aquisição de fatores de virulência e resistência, quando estudados isolados de enterococos em amostras fecais. Diferenças na diversidade das espécies juntamente à frequência de genes e resistência foram encontradas. Confinamento, habitat, dieta e contato humano são fatores que podem ser responsáveis por essas diferenças (Adesiyun et al., 1998). Desta forma, uma preocupação em relação à presença destas características nestes animais deve ser evidenciada. Com base nos resultados do trabalho, algumas providências são citadas a fim de mitigar, remediar ou prevenir estes achados em comunidades selvagens.

A pesquisa (1) destas informações através de evidências científicas são extremamente importantes, a fim de monitorar a disseminação de resistência e virulência no ambiente selvagem; estudos comparativos (2) entre animais-humanos-criação em relação às correlações genéticas; a utilização de métodos mais eficientes em tratamentos de efluentes hospitalares (3), ou a necessidade da real desinfecção (4) dos efluentes finais da estação de tratamento de águas residuais (Luczkiewicz et al., 2010) são hipóteses a serem avaliadas; o controle (5) do uso de antibióticos, o limitando apenas para tratamentos terapêuticos de humanos e animais, erradicando o uso para

promoção do crescimento de animais criados para abate e prevenção de doenças em animais saudáveis, à fim de ajudar na preservação da eficácia dos antibióticos; avaliação do uso de terapia alternada (6), onde pares de compostos antimicrobianos são ciclados durante o tratamento, inibindo ou diminuindo a resistência (Kim et al., 2014). E através da educação ambiental reduzir a poluição (7) e assim preservar o habitat de animais selvagens, para que os mesmos não sintam necessidade de buscar alimentação através do contato humano (8). Oferecimento de treinamento e palestras de educação ambiental para aos visitantes do Parque da Gruta do Índio e moradores de São Sebastião do Caí devem ser realizadas para que não sejam mais ofertados alimentos humanos industrializados aos animais selvagens, mais especificamente os macacos-prego, uma vez que essa ação interfere no metabolismo destes animais. Uma proposta para mitigar o problema da alimentação oferecida aos animais pelos visitantes do parque (SCS) e pelos moradores (SSC) das cidades, é a implementação de placas informativas (Figura 3) nos locais onde há a presença destes mamíferos, com uma linguagem compreensível e com o objetivo de repassar informações à população sobre os riscos que estes alimentos podem trazer para os macacos e para o próprio ser humano, uma vez que mordidas e arranhões também podem desempenhar um papel na transmissão de patógenos (Wolfe et al., 1998).

Figura 3: Placa informativa para possivelmente implementar nos locais onde os macacos-prego são alimentados com frequência com alimentos industrializados.




**NÃO ALIMENTE OS  
MACACOS-PREGO E NÃO  
DEIXE ALIMENTOS  
DISPONÍVEIS!**

Animais selvagens como o macaco-prego (*Sapajus nigritus*) não devem ser tocados e alimentados porque:

- Alimentos humanos interferem no metabolismo dos macacos deixando-os vulneráveis à doenças;
- Pode haver transmissão de bactérias dos macacos para o ser humano. Essas bactérias são benéficas aos macacos, porém podem causar doenças no ser humano;
- Lembrando que é proibida a caça, perseguição e maus tratos aos animais selvagens, conforme Lei Nº 5.197, de 3 de Janeiro de 1967.

**RECOLHA SEU LIXO, A NATUREZA AGRADECE**





## 7. CONCLUSÃO

Foram identificados 296 isolados de *Enterococcus* sp. a partir de suabes e fezes de macacos-prego da espécie *S. nigritus* de três regiões do estado do Rio Grande do Sul. Destes, 137 isolados de *Enterococcus* sp. eram provenientes de macacos de SSC, 86 de macacos de SCS e 73 de macacos do ZOO. As espécies mais encontradas foram *E. faecalis*, seguido de *E. hirae* e *E. faecium*.

Os resultados de amostras não suscetíveis foram mais atribuídos aos antimicrobianos rifampicina, tetraciclina e eritromicina. O perfil de múltipla resistência foi encontrado nos isolados de *Enterococcus* sp. provenientes de macacos de SSC, SCS e ZOO. Os isolados de *Enterococcus* sp. de macacos de SSC apresentaram maiores frequências amostras não suscetíveis aos antimicrobianos rifampicina, tetraciclina, norfloxacin e ampicilina, apresentando diferença estatística significativa ao antimicrobiano tetraciclina. Dentre as espécies estudadas, *E. faecalis* apresentou as maiores resistências, seguido de *E. faecium*.

Em relação à presença de genes relacionados à resistência em enterococos, os isolados de macacos do ZOO apresentaram maiores índices para os genes *msrC*, *gyrA* e *tetL*. Para o gene *tetM* os isolados de *Enterococcus* sp. de macacos de SCS apresentaram maior frequência. Para os genes relacionados à virulência, os isolados de macacos de SSC e SCS apresentaram as maiores porcentagens para o gene *gelE*. Para *esp*, *ace* e *agg*, os isolados de macacos de SCS apresentaram as maiores porcentagens. No geral, o gene de resistência mais prevalente entre os isolados foi *tetM* e gene de virulência mais presente destacou-se o gene *gelE* e *ace*.

As elevadas resistências e presenças de genes de resistência e virulência nos *Enterococcus* sp. isolados de amostras fecais dos macacos-prego foram atribuídas tanto à ação antropogênica encontrada no habitat dos macacos como através do próprio resistoma ambiental. Como perspectivas, serão realizadas coletas de macacos-prego com nenhum contato humano, a fim de comparar os resultados e verificar se haverá resistência e / ou virulência

nestas amostras. Desta forma, poderá se caracterizar os bandos de macacos através de características como alimentação, habitat e contato humano.



## 8. REFERÊNCIAS

- Aakra A, Vebo H, Indahl U, Snipen L, Gjerstad O, Lunde M, Nes IF. 2010. Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Chloramphenicol Treatment. *International Journal of Medical Microbiology*. 483048: 1-10.
- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 37(2):127-137.
- Abou-zeid AA, Eissa A, Salemi HM. 1978. Mode of Action of Gentamicin Antibiotics Produced by *Micromonospora purpurea*. *Zentralbl Bakteriell Naturwiss*. 133: 362-368.
- Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, López RL, Grande MJ, Martínez-Viedma P, Ortega E, Cañamero MM, Galvez A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*. 123(1-2): 38-49.
- Adesiyun AA, Seepersadsingh N, Inder L, Caesar K. 1998. Some bacterial enteropathogens in wildlife and racing pigeons from Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases*. 34(1): 73-80.
- Adhikari L. 2010. High-level Aminoglycoside Resistance and Reduced Susceptibility to Vancomycin in Nosocomial Enterococci. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2(3): 231-236.
- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 53(10): 1565–1574.
- Alfaro JWL, Jr JSS, Rylands AB. 2012. How different are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *American Journal of Primatology*. 74(4): 273-286.
- Alfouzan W, Al-Sheridah S, Al-Jabban A, Dhar R, Al-Mutairi AR, Udo E. 2014. A case of multiple splenic abscesses due to *Enterococcus hirae*. *JMM Case Report*. 1-4.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. 8(4): 251-259.

- Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. 134(1): 1-7.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. 2004. Brasil: ANVISA; 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf)>. Acesso em: 18 fev. 2017.
- Arias CA, Courvalin P, Reynolds PE. 2000. vanC Cluster of vancomycin-Resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(6): 1660-1666.
- Bambeke FV, Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. 2017. **Mechanisms of Action**. Em: Cohen J, Powderly W, Opal S. (Eds). *Infectious Diseases*. Elsevier/Mosby. 1162-1180p.
- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. 2012. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS one*. 7(4):1-11.
- Bicca-Marques JC. 2003. **How do Howler Monkeys Cope with Habitat Fragmentation?** Em: Marsh LK (eds). *Primates in Fragments*. Springer, Boston, MA. 404p.
- Billström H, Sulliva A, Lund B. 2008. Cross-transmission of clinical *Enterococcus faecium* in relation to *esp* and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 105(6): 2115-2122.
- Boeckel TPV, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 14(8): 742-750.
- Brenden R, Janda JM. 1987. Detection, quantitation and stability of the p haemolysin of *Aeromonas* spp. *Journal of Medical Microbiology*. 24: 247-251.
- Brickner SJ, Hutchinson DK, Barbachyn MR, Manninen PR, Ulanowicz DA, Garmon SA, Grega KC, Hendges SK, Toops DS, Ford CW, Zurenko GE. 1996. Synthesis and Antibacterial Activity of U-100592 and U-100766, Two Oxazolidinone Antibacterial Agents for the Potential Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Positive Bacterial Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(3): 673-679.
- Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB. 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent,

- municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of The Total Environment*. 366(2-3): 772-783.
- Burdett V. 1991. Purification and Characterization of *Tet(M)*, a Protein That Renders Ribosomes Resistant to Tetracycline. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(5): 2872-2877.
- Burleson BS, Ritchie DJ, CCP, Micek ST, Dunne WM. 2004. *Enterococcus faecalis* Resistant to Linezolid: Case Series and Review of the Literature. *Pharmacotherapy*. 24(9): 1225-1231.
- Calvignac-Spencer S, Leendertz SAJ, Gillespie TR, Leendertz FH. 2012. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(6): 521–527.
- Carniol K, Gilmore M. 2006. *Enterococcus faecalis* cytolysin toxin. Em: Alouf JE, Popoff M (Eds). **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxin**. Elsevier. 1200 p.
- Cassenego APV, d'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(2): 480-488.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. 2003. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *The New England Journal of Medicine*. 348(14): 1342- 1347.
- Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P. 1994. Presence of the *Listeria* Tetracycline Resistance Gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38(10): 2330-2335.
- Choi JM, Woo GJ. 2015. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*. 70(4):476 – 484.
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2): 232-260.
- Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. 1992. Isolation of a 3-Lactamase-Producing, Aminoglycoside-Resistant Strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36(5): 1125-1126.

- Chow JW. 2000. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 31(2): 586-589.
- Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn154.5 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology*. 3(6): 229-236.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – twelve-six edition**. 2016. Wayne, PA. CLSI document 100S. 251 p.
- Coburn OS, Gilmore MS. 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*. 5(10): 661-669.
- Courvalin P. 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1): S25-S34.
- Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, Nickerson CA, Schurr MJ. 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed  $-80^{\circ}\text{C}$  bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*. 75(1): 135–138.
- Comerlato CB, Resende MCC, Caierão J, d’Azevedo PA. 2013. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(5): 590-595.
- Costa LXF. 2018. Isolamento, identificação de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Enterococcus* sp. de amostras de fezes de morcegos *tadarida brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Agrícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Coutinho FH, Pinto LH, Vieira RP, Martins OB, Salloto GRB, Santoro DO, Clementino MM, Cardoso AM. 2013. Perspectives in Water Pollution. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/perspectives-in-water-pollution/antibiotic-resistance-in-aquatic-environments-of-rio-de-janeiro-brazil>>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- Cunha BA. 1989. Nitrofurantoin: An update. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 44(5): 399-406.
- Cunha BA. 2006. New Uses for Older Antibiotics: Nitrofurantoin, Amikacin, Colistin, Polymyxin B, Doxycycline, and Minocycline Revisited. *The Medical Clinics of North America*. 90(6): 1089-1107.

- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the Antibiotic Resistome. *Science*. 311(5759):374-377.
- Davies J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 33(7): 496–499.
- De Vuyst L, Moreno MRF, Revets H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*. 84(3): 299–318.
- Demirgöl F, Tuncer Y. 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 37(5): 670-681.
- Devriese LA, Kerckhove AV, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. 1987. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37(3): 257-259.
- Devriese L, Baele M, Butaye P, 2006. The Genus *Enterococcus*. Em: Dworkin M (Eds). **The Prokaryotes**. Springer New York, NY. 1140 p.
- Dicpinigaitis PV, Aguirre MD, Divito J. 2015. *Enterococcus hirae* Bacteremia Associated with Acute Pancreatitis and Septic Shock. *Case Reports in Infectious Diseases*. 1-3.
- Diekema DJ, Jones RN. 2001. Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet*. 358(9297): 1975-1982.
- Dizavandi ZR, Aliakbar A, Sheykhhan M. 2016. A novel Pb-poly aminophenol glassy carbon electrode for determination of tetracycline by adsorptive differential pulse cathodic stripping voltammetry. *Electrochimica Acta*. 227: 345-356.
- Doi RH, Brown LR, Rodgers G, Hsu Y. 1970. *Bacillus subtilis* Mutant Altered in Spore Morphology and in RNA Polymerase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 66(2): 404-410.
- Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificação discrepantes**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Drahovská H, Slobodníková L, Kocíncová D, Seman M, Končeková R, Trupl J, Turna J. 2004. Antibiotic Resistance and Virulence Factors among

- Clinical and Food Enterococci Isolated in Slovakia. *Folia Microbiologica*. 46(6): 763-768.
- Dunny GM, Leonard BAB, Hedberg PJ. 1995. Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. *Journal of Bacteriology*. 177(4): 871-876.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1): 24-27.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environment Microbiology*. 67(4): 1628-1635.
- EFSA/ECDC - European Food Safety Authority and ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. **The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011.** *EFSA Journal* 11:359p.
- Ehrlich J, Quentin RB, Smith RM, Joslyn DA. 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. *Science*. 106(2757): 417.
- Elavarashi E, Kindo AJ, Rangarajan S. 2017. Enzymatic and Non-Enzymatic Virulence Activities of Dermatophytes on Solid Media. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11(2): DC23-DC25.
- Epe B, Woolley P, Harnig W. 1987. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 213(2): 443-7.
- Facklam RR. 1973. Comparison of Several Laboratory Media for Presumptive Identification of Enterococci and Group D Streptococci. *Journal of Applied Microbiology*. 26(2): 138-145.
- Favoretto SR, Mattos CC, Morais NB, Araújo FAA, Mattos CA. 2001. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 7(6): 1062-1065.
- Fernandez R, Lucas E, McGinnis J. 1973. Influence of Diet Composition on Chick Growth Response to Different Antibiotics, Feed Additives and Combination of the Additives. *Poultry Science*. 52(6): 2299-2305.
- Ferreira DRA, Ribeiro VO, Laroque PO, Wagner PGC, Júnior JWP, Silva JCA, Dubey JP, Rêgo EW, Mota RA. 2015. Risk Factors Associated

- with *Toxoplasma gondii* Infection in Captive *Sapajus* spp. *American Journal of Primatology*. 77(5):558–562.
- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155(Pt6): 1749-1757.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. 10(3): 226-236.
- Fontana R, Canepari P, Lleo MM, Satta G. 1990. Mechanisms of Resistance of Enterococci to Beta-Lactam Antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 9(2): 103-105.
- Fragaszy DM, Visalberghi E, Fedigan LM. 2004. **Taxonomy, distribution and conservation: Where and what are they and how did they get there.** Em: Fragaszy DM Visalberghi E Fedigan LM (eds). *The Complete Capuchin: The Biology of the Genus Cebus*. United Kingdom: University of Cambridge Press. 356p. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=A6TmtS\\_qOwgC&pg=PA1&hl=pt-BR&source=gbs\\_toc\\_r&cad=3#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=A6TmtS_qOwgC&pg=PA1&hl=pt-BR&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon J. 2010. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(2): 365–370.
- Fujimoto G. 2011. Estudo de fatores de virulência e propriedades tecnológicas de culturas de *Enterococcus* spp isoladas de queijo de coalho. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Furness LE, Campbell A, Zhang L, Gaze WH, McDonald RA. 2017. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research*. 154: 28-34.
- Furumura MT, Figueiredo PMS, Carbonell GV, Darini ALC, Yano T. 2006. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(3): 230-236.
- Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*. 2(4): 2-7.

- Gillings MR, Stokes HW. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology & Evolution*. 27(6): 346-352.
- Glover BA. 2014. Characterization and resistance profiles of selected enteric bacteria isolated from non-human primates at a wildlife-human interface. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade de Pretoria, África do Sul.
- Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Estoff EL, Chapman CA. 2008. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerging Infectious Diseases journal*. 14(9): 1375-1382.
- Goldstein BP. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*. 67(9): 625-630.
- Gonçalves A, Igrejas G, Radhouani H, Santos T, Monteiro R, Pacheco R, Alcaide E, Zorrilla I, Serra R, Torres C, Poeta P. 2013. Detection of antibiotic resistant enterococci and *Escherichia coli* in free range Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Science of the Total Environment*. 115(9): 115-119.
- Gothwal R, Shashidhar T. 2014. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 43(4): 479-489.
- Hacker J, Kaper JB. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*. 54: 641-679.
- Hancock LE, Perego M. 2004. The *Enterococcus faecalis* fsr Two-Component System Controls Biofilm Development through Production of Gelatinase. *Journal of Bacteriology*. 186(17): 5629-5639.
- Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. 1999. The macrolide–ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Molecular Microbiology*. 31(2): 623–631.
- Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. 1998. Survival of *Enterococcus faecalis* in an Oligotrophic Microcosm: Changes in Morphology, Development of General Stress Resistance, and Analysis of Protein Synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11): 4238-4245.
- Hartmann G, Honikel KO, Knüsel F, Nüesch J. 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 145(3): 843-844.



- Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. 2016. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*. 32(1): 55-67.
- Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. 2007. Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology*. 189(22): 8233-8240.
- Herman DJ, Gerding DN. 1991. Antimicrobial Resistance among Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(1): 1-4.
- Hooper DC. 2001. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 7(2): 337-341.
- Hospital Sagrada Família. **Estrutura**. 2018. Disponível em: <<http://www.hsagradafamilia.com.br/estrutura.php>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **São Sebastião do Caí**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/sao-sebastiao-do-cai/panorama>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Santa Cruz do Sul**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/santa-cruz-do-sul/panorama>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. 1987. High Incidence of Hemolysin Production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* Strains Associated with Human Parenteral Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 25(8): 1524-1528.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. **Sapajus nigritus**. 2017. Gland, Suíça: IUCN; 2017. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/136717/0>>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- Jahan M, Krause DO, Holley RA. 2013. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *International Journal of Food Microbiology*. 163(2-3): 89-95.
- Janda JM, Abbott SL. 1993. Expression of Hemolytic Activity by *Plesiomonas shigelloides*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(5): 1206-1208.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(11):3497-503.

- Kim S, Lieberman TD, Kishony R. 2014. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(40): 14494–14499.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine*. 22(7): 822-830.
- Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. 1992. Aggregation Substance of *Enterococcus faecalis* Mediates Adhesion to Cultured Renal Tubular Cells. *Infection and Immunity*. 60(1): 25-30.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, (Eds). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Lambais MR, Crowley DE, Cury JC, Büll RC, Rodrigues RR. 2006. Bacterial diversity in tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science*. 312(5782):1917.
- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. 2012. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*. 127(1): 4-22.
- Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, Melo CB, Vasconcelos PFC, Castro MB. 2016. Frequency of histopathological changes in Howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 49(1): 29-33.
- Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Hartke A, Yanick Auffray, Giard JC. 2009. *ace*, Which Encodes an Adhesin in *Enterococcus faecalis*, Is Regulated by *Ers* and Is Involved in Virulence. *Infection and Immunity*. 77(7): 2832-2839.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (Eds). **Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Leclercq R, Courvalin P. 1991. Bacterial Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Antibiotics by Target Modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(7): 1267-1272.

- Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. 1989. Transferable Vancomycin and Teicoplanin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(1): 10-15.
- Leroy EM, Gonzalez JP, Baize S. 2011. Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clinical Microbiology and Infection*. 17(7): 964-976.
- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives: A New Class of Chemotherapeutic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 5(5): 1063–1065.
- Levin ED, Muratova GL, Stepanov VM. 1965. Characteristics of gelatinase - a proteolytic enzyme associated with pig pepsin. *Chemistry of Natural Compounds*. 1(3): 160-164.
- Licht TR, Wilcks A. 2005. Conjugative Gene Transfer in the Gastrointestinal Environment. *Advances in Applied Microbiology*. 58C: 77-95.
- Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ, Marotti KR. 1997. The Oxazolidinone Eperezolid Binds to the 50S Ribosomal Subunit and Competes with Binding of Chloramphenicol and Lincomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(10): 2127-2131.
- Liu Q, Ponnuraj K, Xu Y, Ganesh VK, Sillanpaa J, Murray BE, Narayana SVL, Hook M. 2007. The *Enterococcus faecalis* MSCRAMM ACE Binds Its Ligand by the Collagen Hug Model. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(27): 19629-19637.
- López M, Tenorio C, Del Campo R, Zarazaga M, Torres C. 2011. Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone Resistance in Vancomycin-Resistant enterococci of Different Origins. *Journal of Chemotherapy*. 23(2): 87-91.
- LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: List D – L. 2018. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- Luczkiewicz A, Jankowska K, Fudala-Ksiazek S, Olanczuk-Neyman K. 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*. 44(17): 5089-5097.
- Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P. 1966. Rifampicin: A new orally active rifamycin. *Chemotherapy*. 11: 285-292.

- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupré I, Sechi LA. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3): 291-304.
- Mao JCH, Putterman M, Wiegand RG. 1970. Biochemical basis for the selective toxicity of erythromycin. *Biochemical Pharmacology*. 19(2): 391-399.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aditivos melhoradores de desempenho e anticoccidianos registrados na cpaa/dfip**. 2015. Brasil: MAPA; 2015. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivosautorizadoscomomdeanticoccidianos201525abrilPortalMAPAverso02.10.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2018.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 26/2009 - Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário**. 2009. Brasil: MAPA; 2015. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58(1): 59-65.
- Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. 2002. Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(10): 3334-3336.
- Martel JL, Tardy F, Sander P, Boisseau J. 2001. New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Veterinary Research*. 32(3-4): 381–392.
- Martin JD, Mundt JO. 1972. Enterococci in Insects. *Journal of Applied Microbiology*. 24(4): 575-580.
- Martinez JL. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. 157(11): 2893–2902.

- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon AP. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1):327-332.
- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV1, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon APG. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1): 327-332.
- Medeiros AW. 2011. **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*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Meena S, Mohapatra S, Sood S, Dhawan B, Das BK, Kapil A. 2017. Revisiting Nitrofurantoin for Vancomycin Resistant Enterococci. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11(6): 19-22.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 12(10): 1221–1236.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira**. 2018. Brasil: MMA; 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 24 abr. 2018.
- Mohamed JA, Huang DB. 2007. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 56(Pt12): 1581-1588.
- Molale LG, Bezuidenhout CC. 2016. Antibiotic resistance, efflux pump genes and virulence determinants in *Enterococcus* spp. from surface water systems. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(21): 21501-21510.
- Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106(1): 1-24.
- Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, d'Azevedo PV, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5):617-621.

- Moy TI, Mylonakis E, Calderwood SB, Ausubel FM. 2004. Cytotoxicity of Hydrogen Peroxide Produced by *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*. 72(8): 4512-4520.
- Muehlenbein MP. 2017. Primates on display: Potential disease consequences beyond bushmeat. *American Journal of Physical Anthropology*. 162(63): 32–43
- Mundt JO. 1962. Occurrence of Enterococci on Plants in a Wild Environment. *Journal of Applied Microbiology*. 11: 141-144.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. 2000. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(4): 513–522.
- Município de Santa Cruz do Sul. Histórico do município. 2018. Disponível em: < <http://www.santacruz.rs.gov.br/>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- Município de Santa Cruz do Sul. Parque da gruta. 2018. Disponível em: < <http://www.santacruz.rs.gov.br/municipio/parque-da-gruta>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2): 1-37.
- Murray BE. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Review*. 3(1): 46-65.
- Murray IA, Shaw WV. 1997. O-Acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(1): 1-6.
- Mus TE, Cetinkaya F, Cibik R, Soyutemi GE, Simsek H, Coplu N. 2017. Pathogenicity determinants and antibiotic resistance profiles of enterococci from foods of animal origin in turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*. 65(4): 461-474.
- Nachtigall G, Jesus AG, Zvoboda DA, Santestevan NA, Minotto E, Moura TM, d'Azevedo P, Frazzon J, Sand SVD, Frazzon APG. 2013. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*. 11(2): 235-241.
- Nakajima Y. 2002. Mode of Action and Resistance Mechanisms of Antimicrobial Macrolides. Em: Omura S (Eds). **Macrolide Antibiotics**. Academic Press. 635 p.

- Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. 1989. *gyrA* and *gyrB* Mutations in Quinolone-Resistant Strains of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(2): 254-255.
- Nakanishi N, Yoshida S, Wakebe H, Inoue M, Mitsuhashi S. 1991. Mechanisms of Clinical Resistance to Fluoroquinolones in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(6): 1053-1059.
- Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Zhao M, Murray BE. 2011. Relative Contributions of Ebp Pili and the Collagen Adhesin Ace to Host Extracellular Matrix Protein Adherence and Experimental Urinary Tract Infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infection and Immunity*. 79(7): 2901-2910.
- Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 395(5): 559–575.
- Noble WC, Virani Z, Cree RGA. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus* FEMS *Microbiology Letters*. 72(2): 195-198.
- Norconk MA, Boinski S, Forget PM. 2011. Primates in 21st century ecosystems: Does primate conservation promote ecosystem conservation? *American Journal of Primatology*. 73(1): 3-8.
- Norris AH, Reilly JP, Edelstein PH, Brennan PJ, Schuster MG. 1995. Chloramphenicol for the Treatment of Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 20(5):1137-1144.
- NRC - National Research Council of the National Academies. **Nutrient requirements of nonhuman primates**. 2003. Washington, DC: NRC; 2003. Disponível em: < <https://www.nap.edu/read/9826/chapter/1>>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- Olson DM, Dinerstein E. 2002. The global 200: priority ecoregions for global conservation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 89(2): 199-224.
- Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA, Patton JL. 2011. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição. *Conservation International*. 2: 1-74.
- Pãosinho A, Azevedo T, Alves JV, Costa IA, Carvalho G, Peres SR, Baptista T, Borges F, Mansinho K. 2016. Acute Pyelonephritis with Bacteremia Caused by *Enterococcus hirae*: A Rare Infection in Humans. *Case Reports in Infectious Diseases*. 1-3.

- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. 1994. MSCRAMM - Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annual Review of Microbiology*. 48: 585-617.
- Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. 299(5615): 2071-2074.
- Peng Z, Li M, Wang W, Liu H, Fanning S, Hu Y, Zhang J, Li F. 2017. Genomic insights into the pathogenicity and environmental adaptability of *Enterococcus hirae* R17 isolated from pork offered for retail sale. *MicrobiologyOpen*. 6(6): 1-15.
- Petersen A, Jensen LB. 2004. Analysis of *gyrA* and *parC* mutations in enterococci from environmental samples with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *FEMS Microbiology Letters*. 231(1): 73-76.
- Peterson JW. 1996. Bacterial pathogenesis. Em: Baron S (Eds). **Medical Microbiology**. University of Texas medical branch at Galveston, Galveston (tx). 1273p.
- Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FVB, Assis DM, Juliano L, Gales AC. 2013. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 76(1): 80-85.
- Poeta P, Costa D, Saenz Y, Klib N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. 2005. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine*. 52(9): 396-402.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez J, Torres C. 2000. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(4): 967-971.
- Prichula J. 2015. **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**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.



- Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Tolfo NCC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, d'Azevedo PA, Frazzon APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 105(1): 51-57.
- Putzer H, Laalami S. 2013. Regulation of the Expression of Aminoacyl-tRNA Synthetases and Translation Factors. Em: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Adhesion Molecules.
- Rabussay D, Zillig W. 1969. A rifampicin resistant RNA-polymerase from *E. coli* altered in the  $\beta$ -subunit. *FEBS Letters*. 5(2): 104-106.
- Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G. 2014. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*. 5(23): 1-12.
- Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. 2011. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. *BMC Microbiology*. 11(201): 1-13.
- REFLORA – Flora do Brasil 2020. Brazilian Flora 2020. 2018. Disponível em:  
<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=en#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- Renquist DM, Whitney RA. 1987. Zoonoses Acquired from Pet Primates. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 17(1): 219-240.
- Ricaurte JC, Boucher HW, Turett GS, Moellering RC, LaBombardi VJ, Kislak JW. 2001. Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(1): 17-21.
- Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SVL, Weinstock GM, Murray BE, Höök M. 1999. Ace Is a Collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(38): 26939–26945.
- Roberts MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. 245(2): 195-203.
- Rodríguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Barceló D, Balcázar JL. 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban

- wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*. 69: 234-242.
- Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, Levy SB. 1985. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wild Primates: Increased Prevalence in Baboons Feeding on Human Refuse. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(4): 791-794.
- Rudra P, Hurst-Hess K, Lappierre P, Ghosh P. 2018. High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* is conferred by a tetracycline- modifying monooxygenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1-25.
- Ruggero KA, Schroeder LK, Schreckenberger PC, Mankin AS, Quinn JP. 2003. Nosocomial superinfections due to linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: evidence for a gene dosage effect on linezolid MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 47(3): 511-513.
- Rylands AB, Fonseca GAB, Leite YLR, Mittermeier RA. 1996. Primates of the Atlantic Forest: Origin, distributions, endemism, and communities. Em: Norconk MA, Rosenberger AL, Garber PA (Eds). **Adaptive Radiations of Neotropical Primates**. Springer, Boston. 555p.
- Rylands AB, Mittermeier RA, Jr JSS. 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*. 46(1): 11–24.
- 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. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South America fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantartic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(12): 1935-1946.
- Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resende R, Gonçalves A, Marinho C, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P. 2013. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*. 24: 25-31.
- São Sebastião do Caí. A cidade. 2018. Disponível em: <<http://www.saosebastiaodocai.rs.gov.br/site/208-2/>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. 2017. Can Maldi-tof mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends in Microbiology*. 25(6): 447-455.

- Savelsbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W. 2009. Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation. *RNA*. 15(5): 772-780.
- SBP – Sociedade Brasileira de Primatologia. **Os primatas**. 2016. Brasil: SBP; 2016. Disponível em: <<http://sbprimatologia.org.br/os-primatas/>>. Acesso em: 24 abr. 2018.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. 1942. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Experimental Biology and Medicine*. 1: 66-69.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34(1): 31-34.
- Schnappinger D, Hillen W. 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*. 165(6): 359–369.
- Scott, TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. 2005. Potential Use of a Host Associated Molecular Marker in *Enterococcus faecium* as an Index of Human Fecal Pollution. *Environmental Science & Technology*. 39(1): 283-287.
- SEMA – Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. G030 - Bacia hidrográfica do Rio Cai. 2018. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/g030-bacia-hidrografica-do-rio-cai>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MLS. 1999. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infection and Immunity*. 67(1): 193-200.
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycinresistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 417(6890): 746-750.
- Sharp PM, Hahn BH. 2010. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 365(1552): 2487–2494.
- Sherman JM. 1937. The streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1(1): 3-97.
- Shil RK, Mojumder S, Sadida FF, Uddin M, Sikdar D. 2014. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Three Phytophagous

- Insect Species. Brazilian Archives of Biology and Technology. 57(6): 927-932.
- Slee AM, Wuonola M, Mcripley RJ, Zajac I, Zawada MJ, Bartholomew PT, Gregory WA, Forbes M. 1987. Oxazolidinones, a New Class of Synthetic Antibacterial Agents: In Vitro and In Vivo Activities of DuP 105 and DuP 721. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31(11): 1791-1797.
- Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. Virulence. 5(5): 634-637.
- SOS Mata Atlântica. **Atlas dos remanescentes florestais**. 2016. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br/>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- SOSMA – SOS Mata Atlântica. **Florestas: A Mata Atlântica**. 2016. Brasil: SOSMA; 2016. Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- Stewart JR, Townsend FI, Lane SM, Dyar E, Hohn AA, Rowles TK, Staggs LA, Wells RS, Balmer BC, Schwacke LH. 2014. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. Diseases of Aquatic Organisms. 108(2): 91-102.
- Sun J, Deng Z, Yan A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 453(2): 254–267.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40(11): 2562-2566.
- Švec P, Devriese LA. Genus I. **Enterococcus** (ex Thiercelin and Jouhaud 1903) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, 32VP. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds.). USA: Springer, 2010, pp. 594-607.
- Thumu SCR, Halami PM. 2012. Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. Anton van Leeuwenhoek. 102(4): 541–551.
- Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming S, Hancock LE. 2010. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis

Caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 78(11): 4936-4943.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa I. 2001. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *App Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4538-4545.

UNESCO - The United Nations Organization for Education, Science and Culture. **Atlantic Forest South-East Reserves**. 2018. Brasil: UNESCO; 2018. Disponível em: <<http://whc.unesco.org/EN/LIST/893>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umopathy BL. 2009. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27(4): 301-305.

Vilanova R, Júnior JSS, Grelle CEV, Marroig G, Cerqueira R. 2005. Limites climáticos e vegetacionais das distribuições de *Cebus nigrinus* e *Cebus robustus* (Cebinae, Platyrrhini). *Neotropical Primates*. 13(1):14-19.

Wehrli W. 1983. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Reviews of Infectious Diseases*. 3: 407-411.

Weisblum B. 1995. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(3): 577-585.

Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems R J, Witte W, Woodford N. 2008. Emergence and spread of Vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance*. 13(47): 1-11.

Werner G, Hildebrandt B, Witte W. 2001. The Newly Described *msrC* Gene Is Not Equally Distributed among All Isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(12):3672–3673.

WHO - World Health Organization. Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. 2017. Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

Willems RJL, Bonten MJM. 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 20(4): 384–390.

- Williamson R, Gutma L, Horaud T, Delbos F, Acarl JF. 1986. Use of Penicillin-binding Proteins for the Identification of Enterococci. *Journal of General Microbiology*. 132(7): 1929-1937.
- Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature*. 447:279-283.
- Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. 1998. Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: The Missing Link? *Emerging Infectious Diseases journal*. 4(2): 149-158.
- Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature*. 5(3): 175-186.
- WWF – World Wide Fund for Nature. **State of the Atlantic Forest**. 2017. Gland, Suíça: WWF; 2018. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/?56542>>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- WWF – World Wide Fund for Nature. **The Atlantic Forest**. 2018. Gland, Suíça: WWF; 2018. Disponível em: <[http://wwf.panda.org/what\\_we\\_do/footprint/agriculture/soy/soyreport/soy\\_and\\_deforestation/the\\_atlantic\\_forest/](http://wwf.panda.org/what_we_do/footprint/agriculture/soy/soyreport/soy_and_deforestation/the_atlantic_forest/)>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- Xavier DB, Rosa AH, Sena HS, Teixeira DS, Tomaz C, Titze-de-Almeida R. 2010. Absence of intestinal colonization by vancomycin resistant enterococci in nonhuman primates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(6):491-496.
- Xu J, Xu Y, Wang H, Guo C, Qiu H, He Y, Zhang Y, Li X, Meng W. 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*. 119:1379-1385.
- Zaú AS. 1998. Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. *Floresta e ambiente*. 5(1):160-170.
- Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng QW, Qu D, Yu ZJ. 2017. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolated in China. *Frontiers in Microbiology*. 8(2338): 1-9.
- ZOO FZB - Zoológico da Fundação Zoobotânica do RS. **Animais do Zoo**. Disponível em: <[http://www.zoo.fzb.rs.gov.br/lista/578/Animais\\_do\\_Zoo](http://www.zoo.fzb.rs.gov.br/lista/578/Animais_do_Zoo)>. Acesso em 12 jun. 2018.

Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, Hook M, Narayana SVL. 2005. A 'Collagen Hug' Model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *The EMBO Journal*. 24(24): 4224–4236.

## 9. APÊNDICES

Apêndice 1: Descrição dos Isolados identificados por espécie, suscetibilidade aos antimicrobianos, presença de genes de resistência e de fatores de virulência.



## 10. ANEXO

Anexo 1: Composição de ração extrusada para primatas, oferecido para a espécie *Sapajus nigritus*, no Zoológico da Fundação Zoobotânica do RS.

100140099		NUVILAB PRIMATAS NEOTROPICAIS		Ração Extrusada para primatas		DSFS803 92-33680	
<b>COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:</b>							
Milho pré-gelatinizado, farelo de soja, leite integral em pó, farinha de carne e ossos, farinha de arroz gelatinizada, soro de leite em pó, açúcar, óleo de soja refinado, cloreto de sódio, concentrado proteico de soja, protenose, levedura de cana, ovo em pó, feno de alfafa, polpa de beterraba, farinha de vísceras de aves, calcário calcítico, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, aroma baunilha, aroma banana, aroma de frutas vermelhas, mananoligosacarídeo, frutoligosacarídeo, aditivo adsorvente de micotoxinas, extrato de yucca, hexametáfosfato de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, zinco aminoácido quelato, manganês aminoácido quelato, proteinado de selênio, triptofano, BHT, BHA.							
<b>NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:</b>							
UMIDADE (max)	120 g/kg	PROTEÍNA BRUTA (min)	240 g/kg	EXTRATO ETÉREO (min)	80 g/kg		
MATÉRIA MINERAL (max)	90 g/kg	FIBRA BRUTA (max)	60 g/kg	FDN (min)	100 g/kg		
CÁLCIO (min-max)	13-15 g/kg	FOSFORO (min)	8.000 mg/kg				
VITAMINAS: VITAMINA A (min) 20.000 UI/kg; VITAMINA D3 (min) 6.000 UI/kg; VITAMINA E (min) 220 UI/kg; VITAMINA K3 (min) 3 mg/kg; VITAMINA B1 (min) 9 mg/kg; VITAMINA B2 (min) 9 mg/kg; VITAMINA B6 (min) 10 mg/kg; VITAMINA B12 (min) 50 mcg/kg; VITAMINA C (min) 800 mg/kg; NIACINA (min) 90 mg/kg; PANTOTEN DE CÁLCIO (min) 40 mg/kg; ÁCIDO FÓLICO (min) 11 mg/kg; BIOTINA (min) 0,3 mg/kg; COLINA (min) 1.500 mg/kg; MINERAIS: SÓDIO (min) 2.200 mg/kg; FERRO (min) 120 mg/kg; MANGANES (min) 39 mg/kg; MANGANES ORGÂNICO (min) 26 mg/kg; ZINCO (min) 96 mg/kg; ZINCO ORGÂNICO (min) 64 mg/kg; COBRE (min) 25 mg/kg; IODO (min) 1,1 mg/kg; SELENIO (min) 0,15 mg/kg; SELENIO ORGÂNICO (min) 0,1 mg/kg; COBALTO (min) 0,35 mg/kg; FLUOR (max) 800 mg/kg; AMINOÁCIDOS: LISINA (min) 14 g/kg; METIONINA (min) 4.800 mg/kg; METIONINA +CISTINA (min) 9.000 mg/kg; TREONINA (min) 9.000 mg/kg; TRIPTOFANO (min) 4.000 mg/kg; ARGININA (min) 9.000 mg/kg; ISOLEUCINA (min) 9.000 mg/kg; LEUCINA (min) 18 g/kg; VALINA (min) 6.500 mg/kg; ADITIVOS: BACILLUS LICHENIFORMIS 1.600.000 UFC/ton; BACILLUS SUBTILIS 1.600.000 UFC/ton; BHT 30 mg/kg; B.H.A. (HID. ANIZOLA BUT.) 1,96 mg/kg; EXTRATO DE YUCCA 400 mg/kg; MANANOLIGOSSACARÍDEO 3.000 mg/kg; FRUTOLIGOSSACARÍDEO 3.000 mg/kg; ÁCIDO LINOLÉICO 19 g/kg; ÁCIDO LINOLÊNICO 2.500 mg/kg; EETA GLUCANO (min) 360 mg/kg.							
<b>INDICAÇÃO:</b> Ração suplementar extrusada indicada para primatas dos gêneros <i>Saimiri</i> e <i>Cebus</i> . Complementar a dieta com frutas e hortaliças. Permitir o livre acesso a água limpa e fresca.							
<b>USO:</b> Produto com grânulos de 6 mm de diâmetro por 50 a 60 mm de comprimento. a) Oferecer de manhã e à tarde, de forma parcelada. b) Oferecer grânulos umedecidos ou na forma de uma papa consistente para animais senis e ou infantis, ou de acordo com a orientação do nutricionista.							
<b>CONSERVAÇÃO:</b> Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.							
<b>TENÇÃO:</b> NÃO PROIBIDO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES*							
DATA DE FABRICAÇÃO: 09/08/2017		VALIDADE: 06 meses após a data de fabricação.					
DATA DE VALIDADE: 05/02/2018		PREÇO ÚNICO: 12,00 kg					

Anexo 2: Artigo submetido a revista *Frontiers in Microbiology*.