

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

Gabriella Oliveira de Araujo

**ESTUDO DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE CANÍDEOS E
FELÍDEOS SELVAGENS DO PAMPA BRASILEIRO**

PORTO ALEGRE
2019

Gabriella Oliveira de Araujo

**ESTUDO DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE CANÍDEOS E
FELÍDEOS SELVAGENS DO PAMPA BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Araujo, Gabriella Oliveira de
Estudo de Enterococcus sp Isolados de Canídeos e
Felídeos Selvagens do Pampa Brasileiro / Gabriella
Oliveira de Araujo. -- 2019.
93 f.
Orientador: 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, 2019.

1. Microbiota. 2. Enterococcus
Graxaim-do-campo. 4. Gato-do-Mato-Grande. 5. Pamp
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).

“I am among those who think that science has great beauty.
A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child
placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu viver esta experiência incrível e contribuir com mais uma humilde gota no imenso oceano de conhecimento.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon, por me receber de braços abertos como parte de sua equipe; pelos ensinamentos valiosos que você teve o cuidado de me transmitir em todos os momentos que passei ao seu lado; por estar presente ao longo de todo o meu desenvolvimento como pesquisadora e como pessoa, usando de toda a sua sensibilidade, carinho, alegria, humildade e sabedoria para me aconselhar e guiar sempre que eu necessitei. As coisas não foram fáceis, mas a sua presença e parceria fez absoluta diferença e por isso serei sempre grata.

À Tiela Trapp Grassotti pela amizade e parceria que me levaram a seguir o sonho de cursar o mestrado no programa de pós-graduação da UFRGS, acreditando sempre em mim, mais do que eu mesma era capaz, e procurando passar seu conhecimento da melhor forma. Serei sempre grata por ter te encontrado!

Ao meu amigo e a pessoa a qual meu coração adotou como um irmão, Daniel Dorneles Guidi. É uma honra poder crescer ao lado de uma das pessoas que mais me inspira a ser alguém cada vez melhor; olhar pra nossa amizade e saber que posso sempre contar contigo, independente do que aconteça. É uma honra fazer parte da tua vida. Te amo muito, obrigada por ser exatamente do jeitinho que você é!

À colega e amiga Rosana Huff, uma pessoa especial que encontrei ao longo da caminhada e que levo para sempre no meu coração. Por seus ensinamentos, pelas risadas, por dividirmos algumas das experiências mais marcantes de nossas vidas juntas e lado a lado superarmos nossos grandes desafios. Somos mais fortes unidas. Obrigada por estar sempre comigo!

Aos colegas do laboratório 222C que através de parcerias, palavras amigas, risadas, ajudas nos experimentos, troca de experiência, tornaram a rotina mais leve e alegre. Agradeço de todo coração a presença de todos vocês. Sucesso a todos!

Ao Felipe Peters e à toda a equipe envolvida na coleta de amostras dos animais selvagens. Obrigada pelo trabalho árduo e extenso que me permitiu ter acesso a uma pesquisa tão importante, assim como pela troca de informações e experiências. Que vocês tenham muito sucesso nessa jornada.

Às parcerias que encontrei por todo o Instituto de Ciências Básicas da Saúde: as técnicas do departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia que sempre me auxiliaram nas mais diversas tarefas; aos colegas e professores dos laboratórios vizinhos que, sempre solícitos, me auxiliaram oferecendo soluções práticas e rápidas para os mais diversos contratemplos; a professora Ana Cláudia, que sempre deixou as portas do laboratório de Virologia abertas para nós; à Raíssa Nunes e Flávia Montagner, vocês me ensinaram muito além de virologia, agradeço por cada momento que passamos juntas filosofando sobre a vida e comendo bolinhos; aos funcionários e estagiários da universidade que sempre me auxiliaram com máxima solicitude; a todos que ofereceram um sorriso, um café, uma palavra amiga enquanto transitávamos nos corredores, apressados. Vocês fizeram a diferença nos meus dias.

Obrigada, seu Antônio e sua equipe pelos seus mais de 50 anos de serviço atencioso no bar. Não é todo mundo que abre um sorriso no rosto de alunos famintos e sonolentos às 6h40 da manhã.

Às estagiárias e ICs Luana Godoy, Letícia Magnaguagno, Renata Perin, Luana Dorneles e Caroline Krahn. Foi um privilégio trabalhar ao lado de vocês, meninas! Aprendi muito mais do que ensinei, podem ter certeza. Guardo vocês no meu coração e torço muito pelo sucesso de vocês, contem sempre com o meu carinho e parceria.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou, em especial à minha mãe que sempre esteve ao meu lado, incentivando, somando forças, investindo, amando e oferecendo tudo ao seu alcance para que eu pudesse ser feliz atingindo meus objetivos. Aos meus avós, Waldyr e Marlene, que torcem por mim a todo momento. Vocês são luzes na minha vida. Agradeço a cada momento por tê-los junto a mim.

Aos meus amigos queridos que estiveram ao meu lado a cada passo, cada dificuldade, cada alegria, cada grito de vitória e sem os quais este trabalho não seria realizado: Daniel Dornelles Guidi, Filipe Fonseca, Jessica Kurtz, Laura Lago, Raquel Henrique, Rosana Huff e Victor Saes. Amo vocês de toda alma, obrigada por oferecerem refúgio, por me darem forças, por torcerem sempre, pelos cafés no campus, pelos memes inteligentíssimos, pelos chopps na Cidade Baixa, pelos conselhos sábios, as piadas bobas que muitas vezes me fizeram chorar de rir, pelos abraços carinhosos, os puxões de orelha amorosos, por lerem e opinarem nas minhas produções científicas, por serem quem são e por dividirem as suas vidas comigo. A minha vida é mais feliz com vocês ao meu lado.

Gratidão!

ESTUDO DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE CANÍDEOS E FELÍDEOS SELVAGENS DO PAMPA BRASILEIRO¹

Autor: Gabriella Oliveira de Araujo

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Enterococos são bactérias gram-positivas encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais. Diversos estudos foram realizados com enterococos isolados de diversas amostras, entretanto poucos com microbiota proveniente de animais selvagens. O presente trabalho teve como objetivos: 1) isolar e avaliar a distribuição de *Enterococcus* spp. a partir de amostras fecais e orais de graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) selvagens encontrados no Bioma Pampa do estado do Rio Grande do Sul, Brasil; 2) avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana e; 3) verificar a presença de genes relacionados à resistência e à virulência. O isolamento foi realizado utilizando-se meios de cultura seletivos e a identificação das espécies foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e MALDI-TOF. O perfil de suscetibilidade frente a 12 antimicrobianos foi testado pelo método de disco difusão. Cepas com susceptibilidade reduzida para tetraciclina e eritromicina foram avaliadas por PCR para a presença dos genes *tetL*, *tetM* e *tetS*; e *msrC* e *ermB*, respectivamente. A determinação de genes de virulência (*ace*, *agg*, *gelE*, *esp* e *cylA*) também foi realizada por meio da técnica de PCR. A atividade das enzimas gelatinase e hemolisinas associada aos genes *gelE* e *cylA*, respectivamente foram determinadas. No total de 114 enterococos (58 de graxaim-do-campo e 56 de gato-do-mato-grande) foram isolados e identificados. *Enterococcus faecalis* foi mais abundante (52,63%), seguido de *E. faecium* (25,43%), *E. casseliflavus* (13,15%), *E. hirae* (7,01%) e *E. durans* (1,75%). Em relação aos animais avaliados, *E. faecalis* foi a espécie mais frequente (41,37% nas amostras de graxaim-do-campo e 64,28% provenientes de gato-do-mato-grande). 99,12% das cepas apresentaram suscetibilidade reduzida a pelo menos um dos antimicrobianos, sendo observada para rifampicina (79,7%), eritromicina (69,56%), ciprofloxacina (36,23%), tetraciclina e estreptomicina (34,78%), norfloxacin e nitrofurantoína (17,39%), gentamicina (10,14%), linezolid e cloranfenicol (2,89%). Dentre os 24 isolados resistentes à tetraciclina, 66,6% apresentaram os genes *tetM* e *tetL*, nenhum o *tetS*. Dos 21 resistentes à eritromicina, 71,42% apresentaram o gene *msrC* e 42,85% *ermB*. Quanto à presença dos genes de virulência, maior incidência foi observada para os genes *ace* (59,64%) e *gelE* (51,75%), seguido por *agg* (21,92%) e *cylA* e *esp* (0,87%). Em conclusão, diferentes espécies de enterococos fazem parte da microbiota intestinal de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande. A presença de resistência e virulência nestes isolados pode estar relacionada a fatores antropogênicos ou com o resistoma ambiental.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (95 pp.) Março, 2019.

STUDY OF *Enterococcus* sp. ISOLATED FROM WILD CANIDS AND FELIDS OF BRAZILIAN PAMPA¹

Author: Gabriella Oliveira de Araujo

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Enterococci are gram-positive bacteria found in human and animal gastrointestinal tract. Many studies were carried out on isolated enterococci from several samples; however few were conducted with microbiota derived from wild animals. The main objectives of the present study were: 1) to isolate and evaluate the distribution of *Enterococcus* spp. from faecal and oral samples of wild pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) and geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) found in Pampa Biome from Rio Grande do Sul, Brazil; 2) to assess the antimicrobial susceptibility profile and; 3) to verify the presence of resistance and virulence related genes. Enterococci isolation was performed using selective culture medium and species identification was conducted by polymerase chain reaction (PCR) and MALDI-TOF. The susceptibility profile towards 12 antimicrobials was tested using a diffusion disc method. Strains with reduced susceptibility to tetracycline and erythromycin were evaluated by PCR for the presence of the *tetL*, *tetM* and *tetS* genes; and *msrC* and *ermB*, respectively. PCR technique was also used to determine the virulence genes (*ace*, *agg*, *gelE*, *esp* e *cylA*). Enzymatic activity of gelatinase and hemolysins associated with *gelE* and *cylA*, respectively, were also determined. In total 114 enterococci (58 from pampas fox and 56 from Geoffroy's cat) were isolated and identified. *Enterococcus faecalis* was the most abundant (52.63%), followed by *E. faecium* (25.43%), *E. hirae* (7.01%) and *E. durans* (1.75%). Regarding to the evaluated animals, *E. faecalis* was the most frequent species (41.37% of pampas fox samples and 64.28% of Geoffroy's cat). 99.12% of the strains showed reduced susceptibility to at least one of the antimicrobials, being observed for rifampicin (79.7%), erythromycin (69.56%), ciprofloxacin (36.23%), tetracycline and streptomycin (34.78%), norfloxacin and nitrofurantoin (17.39%), gentamicin (10.14%), linezolid and chloramphenicol (2.89%). Among the 24 isolates resistant to tetracycline, 66.6% had *tetM* and *tetL* genes and none presented *tetS*. Of the 21 resistant to erythromycin, 71.42% had *msrC* gene and 42.85% had *ermB*. Regarding the presence of the virulence genes, a higher incidence was observed for *ace* (59.64%) and *gelE* (51.75%) genes, followed by *agg* (21.92%), *cylA* (0.87%) and *esp* (0.87%). In conclusion, different enterococci species are part of pampas fox and Geoffroy's cat intestinal microbiota. The presence of resistance and virulence in these isolates may be related to anthropogenic factors or ambient resistome.

¹ Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (95 pp.) March, 2019

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3	Revisão da literatura	4
3.1	Bioma Pampa	4
3.2	Animais encontrados no Bioma Pampa.....	5
3.2.1	A espécie <i>Leopardus geoffroyi</i>	6
3.2.2	A espécie <i>Lycalopex gymnocercus</i>	9
3.3	O gênero <i>Enterococcus</i>	12
3.3.1	Resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i> sp.....	13
3.3.2	Redução de suscetibilidade aos β -Lactâmicos	15
3.3.3	Redução da sensibilidade aos Aminoglicosídeos	16
3.3.4	Redução da sensibilidade aos Macrolídeos	17
3.3.5	Redução de sensibilidade à Quinolonas	18
3.3.6	Redução de sensibilidade à Glicopeptídeos	19
3.3.7	Resistência as Tetraciclinas	19
3.4	Fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> sp.....	20
3.4.1	Substância de agregação - <i>agg</i>	20
3.4.2	Adesina de colágeno - <i>ace</i>	21
3.4.3	Citolisina - <i>cyIA</i>	21
3.4.4	Proteína de superfície de enterococos - <i>esp</i>	21
3.4.5	Gelatinase - <i>geE</i>	22
4	Material e métodos.....	23
4.1	Coletas.....	23
4.2	Pontos de coleta 1 a 5: Candiota - RS	25
4.3	Pontos de Coleta 6 a 10: Arroio Grande.....	26
4.4	Isolamento de <i>Enterococcus</i> sp.	28
4.5	Identificação do gênero enterococos pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	29

4.6 Identificação das espécies usando a técnica de ionização e desorção a laser assistida por matriz MALDI-TOF e PCR	30
4.7 Teste de suscetibilidade antimicrobiana	31
4.8 Detecção de genes de resistência para <i>Enterococcus</i> sp.	31
4.9 Detecção de genes de virulência em <i>Enterococcus</i> sp.	33
4.10 Ensaio para verificação da atividade enzimática - gelatinase	34
4.11 Ensaio para verificação de atividade hemolítica	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Isolamento e presença das espécies de <i>Enterococcus</i> em amostras orais e fecais de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande	36
5.1.1 <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais e oral de graxains-do-campo (<i>L. gymnocercus</i>)	36
5.1.2 <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais e orais de gato-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	37
5.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana	38
5.2.1 Perfil de susceptibilidade dos <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais e orais de graxains-do-campo (<i>Lycalopex gymnocercus</i>)	39
5.2.2 Perfil de susceptibilidade dos <i>Enterococcus</i> spp. obtidos de amostras fecais e orais de gato-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	41
5.3 Presença dos genes <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>msrC</i> e <i>ermB</i> relativos à redução de suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina	42
5.4 Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados	44
5.5 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina, codificadas pelos genes <i>geE</i> e <i>cyIA</i> , respectivamente	47
6 DISCUSSÃO	48
6.1 Distribuição de <i>Enterococcus</i> sp. isolados de amostras de Canídeos e Felídeos	48
6.2 Resistência e Virulência em cepas provenientes de canídeos e felídeos	51
7 Conclusão	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das amostras coletadas de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande.	23
Tabela 2 - Condições de amplificação utilizadas para genes de resistência <i>ermB</i> , <i>msrC</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetS</i>	32
Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes <i>ermB</i> , <i>msrC</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetS</i>	32
Tabela 4 - 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>	33
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>	33
Tabela 6 – Resultado do isolamento de <i>Enterococcus</i> sp. de amostras de graxaim-do-campo e gatos-do-mato-grande.	36
Tabela 7 - Número de <i>Enterococcus</i> sp. identificados nas amostras de graxaim-do-campo (<i>L. gymnocercus</i>).	37
Tabela 8 – Número de <i>Enterococcus</i> sp. identificados nas amostras de gatos-do-mato-grande (<i>L. geoffroyi</i>).	37
Tabela 9 – Número de cepas (%) com sensibilidade e sensibilidade reduzida aos antimicrobiana isoladas de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande por local de coleta.	39
Tabela 10 – Resultado do teste de suscetibilidade reduzida encontrada em isolados provenientes de graxains-do-campo.	40
Tabela 11 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida encontrada em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande.	42
Tabela 12 – Resultado da presença de genes que conferem redução na suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina em amostras de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande.	43
Tabela 13 – Resultado da análise para verificação de presença de genes de virulência e expressão enzimática em amostras de gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da União Internacional para a Conservação da Natureza mostrando em amarelo a distribuição dos gatos-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>) na porção sul do continente Americano. Fonte: https://www.iucnredlist.org	6
Figura 2 - Fotografia de um gato-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>) tirada durante a sua captura. Fonte: Felipe Peters.	8
Figura 3 - Mapa da União Internacional para a Conservação da Natureza mostrando em amarelo a distribuição dos graxains-do-campo (<i>Lycalopex gymnocercus</i>) na porção sul do continente americano. Fonte: https://www.iucnredlist.org	9
Figura 4 - Imagem de um o graxaim-do-campo (<i>Lycalopex gymnocercus</i>). Fonte: Felipe Peters.....	10
Figura 5 - Localização dos fragmentos do Bioma Pampa em Candiota e Arroio Grande no estado brasileiro Rio Grande do Sul, empregados no estudo. Fonte: Google.	24
Figura 6 - Processo de manipulação de um gato-do-mato-grande (esquerda) e um graxaim-do-campo (direita) para a coleta das amostra. Fonte: Felipe Peters.	25
Figura 7 - Pontos de coleta em Candiota -RS. Coordenadas: 1) La 31°28'51.85"S, Lo 53°48'23.22"O; 2) La 31°28'34.28"S, Lo 53°48'45.61"O; 3) La 31°29'00.60"S, Lo 53°48'41.70"O; 4) La 31°28'18.52"S, Lo 53°49'8.32"O; 5) La 31°28'37.62"S, Lo 53°48'59.23"O.....	26
Figura 8 - Pontos de coleta em Arroio Grande –RS. Coordenadas: 6) La 32°20'8.14"S, Lo 52° 54'21.17"O; 7) La 32°18'29.75"S, Lo 52°53'47.53"O; 8) La 32°19'25.90"S, Lo 52°57'10.79"O; 9) La 32°19'53.55"S, Lo 52°55'54.17"O; 10) La 32°19'20.29"S, Lo 52°55'48.11"O.....	27
Figura 9 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana observada para as cepas isoladas das amostras de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande por local de coleta.....	38
Figura 10 – Representação gráfica comparativa dos perfis de virulência em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande e de graxains-do-campo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância
BHI	Ágar Infusão Cérebro Coração (Brain Heart Infusion)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-ácido
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LC	Last Concern
LPSN	List of prokaryotic names with standing in nomenclature
MULTI-SR	Multi-Sensibilidade Reduzida
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PIB	Produto Interno Bruto
PBP	Penicilin-Binding Proteins
RNA _r	Ácido Ribonucleico ribossomal
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SNUC	Sistema Nacional de Unidades de Conservação
SR	Sensibilidade Reduzida
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris Ácido-Bórico EDTA
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	Ágar Triptona de Soja (Tryptone Soya agar)

UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VRE	<i>Enterococcus</i> Vancomicina Resistente

1 INTRODUÇÃO

No Bioma Pampa é encontrada uma grande diversidade de espécies animais e vegetais únicas. No Brasil, este bioma é restrito a apenas 2,07% do seu território e, por apresentar características ambientais de interesse agrícola, vem sofrendo grande perda de território natural.

O contato humano com animais selvagens pode levar a transmissão de microrganismos patogênicos, como relatado por Santos e colaboradores (2013) em que foram encontradas bactérias com suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos em amostras de animais selvagens. Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade de espécies bacterianas e sobre a ecologia de genes que conferem redução na sensibilidade a antimicrobianos na vida selvagem (Allen et al. 2010).

Dentre os microrganismos que apresentam perfil de suscetibilidade reduzida frente a antimicrobianos isolados de animais selvagens destaca-se o gênero *Enterococcus*. Este gênero tem sido observado como parte da microbiota intestinal de diversos animais, como cegonhas, corujas, coelhos, ginetas, aves de rapina, gatos selvagens, lontras, lobos, pegas e macacos-prego, morcegos, lobos marinhos e tartarugas marinhas (Poeta et al., 2005; Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Pereira, 2016; Grassotti, 2018; Costa, 2018). Uma característica deste gênero é a sua capacidade de adquirir e transferir genes que conferem redução na sensibilidade a antimicrobianos. Além disso, são considerados agentes patogênicos oportunistas por possuírem a capacidade de provocar processos infecciosos em situações onde o hospedeiro apresenta quadro clínico de imunodepressão (Gilmore et al., 2014).

A presença de enterococos resistentes nos mais diversos nichos tem sido bastante estudada, entretanto, em amostras provenientes de animais selvagens, a pesquisa é pouco noticiada, provavelmente devido à dificuldade relacionada a manipulação e obtenção de amostras destes animais. Gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo são duas espécies de mamíferos comumente encontradas em áreas nativas do bioma Pampa. Devido ao crescimento progressivo da ocupação humana nestas áreas, o estreitamento do contato com o ser humano, assim como a animais domésticos e de produção, gera preocupações acerca da saúde e da conservação destes animais selvagens em razão da possibilidade de transmissão de

patógenos entre humanos, animais selvagens e domésticos. Estudos realizados em fragmentos de Pampa brasileiro, argentino e uruguaio relatam alguns casos problemáticos decorrentes desta proximidade, tais como: lutas entre animais domésticos em áreas de fazendas que, muitas vezes, culminam na morte de animais selvagens; a caça ilegal de animais selvagens com a finalidade de proteção de propriedade privada ou para a obtenção da pele dos felídeos (Pereira et al., 2010; Bager & Rosa, 2010; Pereira, 2010); atividade de caça predatória de animais selvagens em fazendas que geram prejuízo a pecuaristas; perturbação no forrageio de canídeos e felídeos selvagens devido à redução de roedores nativos, que compõe sua base alimentar e redução da área de vida de gatos-do-mato-grande e de graxains-do-campo (Silva-Rodriguez et al., 2009; Vieira et al., 2008; Santos et al., 2012). Mais estudos devem ser desenvolvidos para compreender a totalidade do impacto gerado pela atividade humana nas populações e na saúde destes animais.

A ausência de estudo sobre enterococos em amostras fecais de graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) selvagens pertencentes ao Bioma Pampa brasileiro, justifica o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das espécies de enterococos isolados de amostras orais e retais de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande, assim como avaliar a presença ou ausência de genes de resistência e virulência nesses isolados.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Isolar e identificar fenotipicamente e genotipicamente as espécies de *Enterococcus* nas amostras orais e retais de graxaim-do-campo e gato-do-mato-grande;

2.2.2 Analisar o perfil de suscetibilidade das cepas frente à antimicrobianos utilizados na terapêutica de humanos e animais;

2.2.3 Detectar a presença de fatores de virulência e resistência nas cepas;

2.2.4 Verificar a atividade das enzimas gelatinase e citolisina das cepas isoladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bioma Pampa

Tem-se por definição que o bioma é uma região com geografia, clima, flora e fauna próprios e característicos. O Brasil é composto por seis biomas distintos: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. De todos estes biomas existentes no Brasil, o Pampa e o Pantanal são os menores, compreendendo 2,07% e 1,76% do total do território nacional brasileiro, respectivamente (Roesch et al., 2009)

O Bioma Pampa é encontrado apenas no estado do Rio Grande do Sul (RS), ocupando 62,2% do território gaúcho. Entretanto, o Pampa se estende também para países estrangeiros: com parte no Paraguai, Argentina e Uruguai. Apenas 0,36% do território brasileiro composto por Bioma Pampa foi transformado em área de conservação no Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), o menor do país (MMA – Ministério do Meio Ambiente, 2019). Como solução, o MMA afirma que o uso sustentável em atividades econômicas é elemento fundamental para a conservação do Bioma Pampa. Nele, a diversificação da produção rural, a valorização da pecuária com manejo em campo nativo, planejamento regional, zoneamento ecológico-econômico e o respeito pelos limites do ecossistema são os caminhos que asseguram todos os aspectos do relacionamento complexo a conservação da biodiversidade e o desenvolvimento econômico e social (Echer et al., 2015).

A vegetação do Bioma Pampa apresenta-se em forma de mosaico composto por grandes áreas de campos, vegetação arbustiva esparsa e formações florestais isoladas. O tipo de clima é subtropical e temperado com as quatro estações bem caracterizadas e com temperaturas anuais que variam entre -10°C e 38°C; chuvas distribuídas ao longo do ano (Roesch et al., 2009). Neste Bioma é encontrada uma grande diversidade de espécies animais e vegetais, sendo considerado como uma das áreas mais ricas em biodiversidade, abrigando espécies ainda não descritas pela ciência. Acredita-se que existam 3.000 espécies vegetais, 578 espécies de aves e mais de 100 espécies de mamíferos terrestres. Por apresentar campos naturais e condições ambientais favoráveis para a criação de gado europeu, o Bioma Pampa é um grande atrativo para atividades pecuárias (Pillar, 2009).

A atividade pecuarista está fortemente ligada à cultura tradicional gaúcha, além de ser de grande importância econômica para o RS, auxiliando na preservação do Bioma Pampa. Em contrapartida, a expansão de monoculturas agrícolas e de pastagem com espécies exóticas tem levado a rápida degradação e descaracterização dos campos sulinos. No campo da agricultura, mais de 60% das áreas do pampa brasileiro foram convertidas em plantações. O cultivo de milho, trigo, soja e eucalipto (silvicultura) são os que mais geram preocupação nas mesas de debate a respeito da conservação (Pereira, 2014).

O Rio Grande do Sul é um dos principais produtores agrícolas do país, possuindo 1137 dos 2302 estabelecimentos agropecuários da região sul brasileira, que contribuem para a participação dos 11,6% do estado no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, de acordo com o censo agropecuário realizado pelo IBGE no ano de 2017 (Borges et al., 2016; IBGE, 2017). A geração de emprego e contribuição econômica do estado é inquestionavelmente importante para o país. Por outro lado, apenas 11,7% da área do Bioma Pampa não tem ocupação humana, não apresenta ação antrópica e mantém seu aspecto fisionômico semelhante a condição original, áreas campestres ou florestais (Echer et al., 2015).

As perdas geradas pela ocupação inadequada de áreas vegetais e, conseqüentemente, a perda de habitat da fauna residente, comprometem o potencial de desenvolvimento sustentável da região. Há comprometimento dos serviços ambientais por espécies vegetais de valor forrageiro, alimentar, ornamental e medicinal; a perda de vegetação campestre que auxilia no controle de erosão do solo e sequestro de carbono que atenuam o efeito estufa, além da extinção de espécies pertencentes a fauna original do Pampa, muitas delas ainda sequer catalogadas (MMA, 2019; Santos & Silva, 2011).

3.2 Animais encontrados no Bioma Pampa

O Bioma Pampa abriga uma grande diversidade de animais, sendo que mais de 100 espécies de mamíferos terrestres são encontrados neste Bioma, incluindo o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), raposa-dos-pampas ou graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), furão (*Galictis cuja*), veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e o tatu-mulita (*Dasypus hybridus*), estando algumas ameaçadas de extinção (Roeh et al., 2009).

3.2.1 A espécie *Leopardus geoffroyi*

De nome popular “gato-do-mato-grande”, o *Leopardus geoffroyi* é um mamífero carnívoro, solitário, pertencente à família dos felídeos. Em termos de taxonomia de gênero, o gato-do-mato-grande foi muito discutido desde sua primeira catalogação em 1844 até o ano de 2005, quando foi inserido na atual classificação. Portanto, é comum encontrar na literatura referências sobre suas sinonímias, as espécies *Oncifelis geoffroyi*, *Felis geoffroyi* e *Felis (Leopardus) geoffroyi* (Pereira & Trigo, 2015)

No Brasil, o gato-do-mato-grande é encontrado apenas no estado do Rio Grande do Sul, na região de influência dos pampas. Estima-se que cerca de 4 mil indivíduos desta espécie vivem atualmente no Bioma Pampa. A extensão de ocorrência deste felídeo é de aproximadamente 3.180.664 km² e engloba a Argentina, Uruguai, sul do Brasil, sul e oeste do Paraguai, centro-sul da Bolívia e pequenas áreas do sudeste do Chile (Figura 1) (Cuyckens et al., 2015; Pereira et al., 2015).

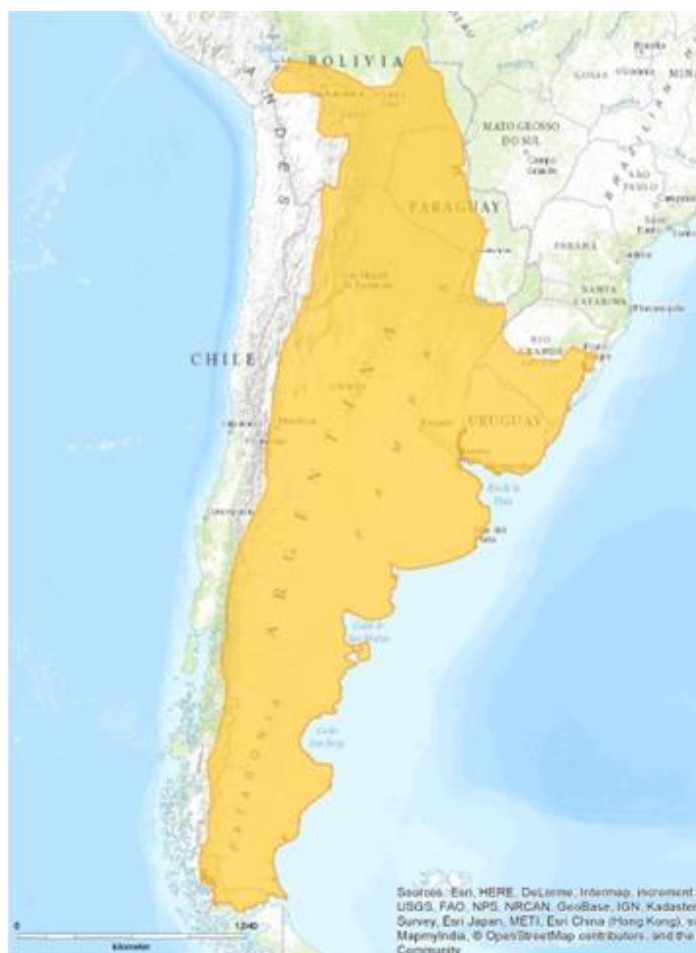


Figura 1 - Mapa da União Internacional para a Conservação da Natureza mostrando em amarelo a distribuição dos gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) na porção sul do continente Americano. Fonte: <https://www.iucnredlist.org>

Monitorado por organizações governamentais e sociedades civis, o gato-do-mato-grande está classificado, em quadro geral, com estado de conservação de menor preocupação (last concern – LC, IUCN *red list*) desde 2013 (Pereira et al., 2015). Entretanto, no Brasil, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) classifica a espécie como vulnerável no estado do Rio Grande do Sul, onde o animal é encontrado (Almeida et al., 2013). Diversos estudos apontam a caça ilegal por peles e proteção à propriedade privada, ataques fatais por animais domésticos, inanição devido à escassez de recursos alimentares e atropelamento em rodovias como as principais causas para o declínio populacional (Pereira et al., 2010; Bager & Rosa, 2010; Pereira, 2010).

A fragmentação florestal e ocupação de terras para uso pecuário são apontados como causa indireta desta classificação, visto que a diminuição de presas e o aumento de competição por território e alimento com outras espécies se intensifica (Pereira, 2010; Bisceglia, et al., 2011). Na Bolívia, a ocorrência simpátrica entre o gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) impacta negativamente na população de gatos-do-mato-grande pela predação intra-guilda, conhecida como efeito pardalis (Pereira, 2010). Internacionalmente, esta espécie é a segunda mais perseguida para comercialização ilegal de pele em uma lista encabeçada pelo lince (*Lynx rufus*) (Scott et al., 2005).

Considerado de tamanho pequeno, o gato-do-mato-grande pesa em média 4,3 kg. Os machos adultos apresentam comprimento de corpo entre 49,8 e 75,0 cm, diferentemente das fêmeas adultas que apresentam menor comprimento corporal variando entre 39,0 e 51,5 cm. O tamanho da cauda também varia entre machos e fêmeas, podendo atingir 27,5 cm de comprimento máximo em machos e 41,0 cm em fêmeas (Figura 2) (Ximenez, 1975; Nascimento, 2014).

Por ser um animal pouco estudado, não se sabe muito a respeito dos hábitos alimentares do gato-do-mato-grande. Entretanto, análises de conteúdo estomacal e intestinal de espécimes vítimas de atropelamento em rodovias revelam a presença majoritária de roedores em sua dieta, dentre estes são relatados roedores silvestres pertencentes aos gêneros *Calomys* sp., *Cavia* sp, *Oligoryzomys* sp. e *Akodon* sp., além das espécies *Mus musculus* (camundongo), *Holochilus brasiliensis* (rato-d'água), *Graomys griseoflavus* (rato-de-orelhas-verdes), *Eligmodontia typus* (camundongo-gerbil-da-patagônia-oriental) e *Oligoryzomys longicaudatus*

(camundongo-de-cauda-longa) (Bisceglia et al., 2011). Mais raramente, porém, relatado em diversos estudos, a espécie alimenta-se de passeriformes, anfíbios, lebres, pequenos répteis e invertebrados (Sousa et al., 2007; Bisceglia et al., 2011; Trigo et al., 2013).



Figura 2 - Fotografia de um gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) tirada durante a sua captura. Fonte: Felipe Peters.

Por seu temperamento territorialista e solitário, a espécie costuma ocupar áreas específicas, porém, apresentam certo grau de tolerância social para com outros indivíduos. Tirelli e colaboradores (2018), determinaram que os machos tendem a habitar maior área de vida do que as fêmeas e que a sua massa corporal está diretamente relacionada com o tamanho da área ocupada.

As implicações do contato do gato-do-mato-grande com o ser humano não foram totalmente esclarecidas até o presente estudo. Entretanto, pesquisas recentes indicam que o gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) é um hospedeiro em potencial de *Giardia* sp., *Diocotophyme renale*, *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides* sp., *Taenia* sp., *Ancylostoma* sp. e *Babesia felis*, havendo a possibilidade de disseminação destes parasitos no meio ambiente, infectando outras espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e o ser humano (Cubas et al., 2014).

A escolha do gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) como alvo de estudo ocorreu em razão da relação de proximidade evolutiva com felídeos domésticos, o contato com o ser humano e o potencial zoonótico da espécie. A escassez de estudos a respeito da microbiota intestinal de felídeos selvagens, principalmente se tratando

de vida livre, assim como infecções zoonóticas em populações humanas, gerando um grave problema de saúde pública e ameaçando a eficácia do controle e erradicação de doenças tratadas em programas nacionais e internacionais (Jorge et al., 2010). Segundo Curi e colaboradores (2010), os canídeos selvagens são ameaçados por diversos patógenos virais, parasíticos e bacterianos, servindo ainda como reservatório para doenças que atingem humanos, animais de interesse econômico e animais domésticos.

O tamanho do graxaim-do-campo varia entre 58,5 cm a 64 cm de comprimento, pesando 4,0 a 6,0 kg (Sillero-Zubiri et al., 2004). Apresenta pelagem densa, com cauda espessa, corpo cinza amarelado, a porção dorsal do alto da cabeça apresenta coloração marrom ferrugínea, peito claro, orelhas largas de extremidades claras assim como os membros, ponta da cauda e focinho escuros (Junior et al., 2016) (Figura 4).



Figura 4 - Imagem de um o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*). Fonte: Felipe Peters.

São onívoros, sendo que a base da sua alimentação é constituída de pequenos vertebrados, em sua maioria mamíferos (tatus, gambás e roedores), aves, lagartos e peixes; gastrópodes; artrópodes (caranguejos e escorpiões); insetos (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homonoptera, Odonata, Orthoptera e larvas de Lepidoptera e Coleoptera); frutos (*Apodanthera sagittifolia*, *Acacia aroma*, *Celtis tala*, *Condalia microphylla*, *Prosopis caldenia*, *Prunus mahaleb*) e carcaças (Sillero-Zubir et al., 2004). Entretanto, sua alimentação pode ainda variar devido a um conjunto de fatores, dentre eles, a localização geográfica, estação do ano, disponibilidade de

presas, competição com outras espécies e mudanças antrópicas em seu habitat (Varela et al., 2008).

Possui hábito crepuscular e noturno, geralmente vivendo de forma solitária ou em pequenas unidades familiares (Faria-Corrêa et al., 2008). Seu habitat é caracterizado por áreas abertas com vegetação formada por gramíneas altas, ambiente sub úmido ou seco, podendo também ser encontrado em florestas tropicais andinas, florestas semidecíduais com montanhas baixas, serrado, dunas de areias, pampas e pastagens (Faria-Corrêa et al., 2008).

A expansão das cidades e a ocupações de áreas silvestres habitadas pelo graxaim-do-campo para criação de animais exerceram impacto na dieta e nos hábitos desta espécie, gerando a diminuição dos locais para predação e aumentando a mortalidade de sua presa (Farias & Kittlein, 2008). A proximidade entre humanos e carnívoros selvagens também gera transtornos em propriedades onde produtores rurais possuem criações de animais para consumo humano como frangos, patos, perus, gansos, ovelhas, entre outros. São relatados episódios em que os animais selvagens, como o graxaim-do-campo, invadem fazendas em busca de alimento, provocando prejuízo econômico e oferecendo risco a animais domésticos e às pessoas em função de ataques diretos (Silva-Rodriguez et al., 2009).

O parentesco próximo entre cachorros (*Canis lupus familiaris*) e os graxains-do-campo propicia maior disseminação de patógenos que oferecem risco tanto para humanos, por contato direto e indireto, quanto para animais domésticos, de criação e as próprias populações de *L. gymnocercus* (Vieira et al., 2008; Santos et al., 2012). Considerando-se que o convívio entre seres humanos e graxains-do-campo tornou-se mais estreito com a expansão das cidades e degradação de áreas de preservação de vida selvagem, suspeita-se que as populações de graxaim-do-campo estejam servindo como hospedeiros de patógenos, facilitando a sua transmissão e dispersão (Monteiro et al., 2015).

O critério para seleção do graxaim-do-campo como alvo do estudo se deve ao fato de apresentar uma sobreposição de nicho com seres humanos em consequência da atividade antropomórfica potencial; a alta mortalidade da espécie em razão da presença de rodovias próximas a fragmentos de mata nativa e sua proximidade evolutiva com animais domésticos, uma vez que espécies intimamente

relacionadas tendem a desenvolver sinais clínicos semelhantes quando infectados por patógenos específicos.

3.3 O gênero *Enterococcus*

Pertencente à família Enterococcaceae, o gênero *Enterococcus* spp. é composto por bactérias em forma de cocos gram-positivos que podem ser encontradas isoladas, em pares ou em cadeia (Gilmore et al., 2014). As espécies pertencentes a este gênero não formam esporos, são anaeróbias facultativas, não produzem gases e apresentam resultado negativo para o teste da catalase (Ogier & Serror, 2008). Possuem metabolismo fermentativo no qual o ácido láctico é o único produto a partir da fermentação da glicose, podendo também fermentar carboidratos (manitol, sorbose, arabinose, sorbitol, rafinose) e hidrolisar esculina na presença de sais biliares à concentração de 40% no meio de cultivo (Gilmore et al., 2014).

A temperatura ideal para o seu crescimento é 35°C, porém há espécies que crescem em uma faixa de 10°C a 45°C (Araújo & Ferreira, 2013). A maioria das espécies crescem a altas concentrações de NaCl (acima de 6,5%), pH 9.6 e são capazes de sobreviver a 60°C por 30 minutos, portanto, são consideradas termodúricas (Carvalho, 2011).

São microrganismos ubíquos encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais, como componentes da sua microbiota natural (Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Grassoti, 2018), porém, por serem microrganismos comensais oportunistas, possuem a capacidade de causar graves infecções em situações em que o hospedeiro apresenta quadro clínico de imunodepressão (Lebreton et al., 2014; Boerlin et al., 2001). Enterococos também podem ser encontrados no intestino de insetos e em diversas fontes ambientais como plantas, alimentos, solo e água (Lebreton et al., 2014). A ubiquidade característica do gênero

Por outro lado, devido à sua capacidade de produzir componentes aromáticos e enzimas específicas, são utilizados pela indústria para dar textura, aroma e sabor a alimentos diversos (queijos, embutidos e produtos fermentados) (Cárdenas et al., 2016). São alvo de muitos estudos para a sua utilização como probiótico devido a sua resistência à ação do suco gástrico e aos sais biliares e por produzirem componentes antimicrobianos (enterocinas). Também, por competirem com microrganismos patogênicos por sítios de adesão em células epiteliais do

intestino, auxiliam na prevenção da colonização e estabelecimento de uma microbiota desfavorável ao hospedeiro (Mansour et al., 2014).

A taxonomia de *Enterococcus* spp. tem mudado consideravelmente desde o ano 2000, sendo intensamente revisada a partir de 2002 devido aos avanços em análises genômica empregando o gene 16S *RNAr* e outras técnicas como sequenciamento de polimorfismos, análise de repetição de sequências curtas e características bioquímicas (Devriese et al., 2006). Atualmente o gênero compreende 56 espécies e duas subespécies (*LPSN- List of prokaryotic names with standing in nomenclature*, 2018). Algumas destas espécies ganharam foco especial em estudos devido ao aumento de casos clínicos onde encontram-se cepas com suscetibilidade reduzida a antimicrobianos, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as mais relatadas (Abat et al., 2016; Miller et al., 2016)

Na última década, o enterococos emergiu mundialmente como um dos mais importantes agentes infecciosos resistentes aos tratamentos conhecidos. O primeiro registro de infecções por enterococos ocorreu em 1899, seguido por inúmeros casos envolvendo infecções pélvicas, neonatais, do trato urinário, endocardite e bacteremia (Handwerker, et al., 1993; Goossens, 1998; Boyce, et al., 1994; Austin et al., 1999; Benenson, et al., 2009; Arias & Murray, 2012).

3.3.1 Resistência antimicrobiana em *Enterococcus* sp.

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, a medicina moderna foi transformada. Os antimicrobianos atuaram como pivô para novas formas de tratamento em pacientes com doenças imunodepressoras, assim como um importante fator para o desenvolvimento de novas técnicas em cirurgias complexas, tais como transplante de órgãos e cardíacas. Como consequência do uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, o mesmo desempenhou papel de catalisador para a seleção de bactérias resistentes. (Arias & Murray, 2012).

Tem-se por definição que a resistência a antimicrobianos se dá quando o tratamento, antes efetivo contra infecções causadas pelo agente patogênico, já não apresenta o efeito esperado. Com o tempo, novos fármacos foram descobertos ou desenvolvidos em resposta a esta resistência, utilizando-se novos mecanismos de ação para alcançar o objetivo esperado. Infelizmente, diversos fatores como uso indevido ou exacerbado dos fármacos, associados a mutações em cepas bacterianas

e troca de material genético entre cepas resistentes e susceptíveis, fizeram com que, ao longo das últimas décadas, a pressão seletiva em populações microbianas estabelecesse novas gerações de microrganismos ainda menos suscetíveis aos fármacos conhecidos, gerando significantes problemas de saúde pública (Arias & Murray, 2012; Miller et al, 2016).

Devido tais fatos, a resistência a antimicrobianos tornou-se uma preocupação mundial. O governo brasileiro implementou algumas medidas com o objetivo de frear o surgimento e disseminação de novas cepas de microrganismos, de diversas espécies, com sensibilidade reduzida a múltiplos antimicrobianos. Dentre elas: 1) a instituição do Programa de Controle de Infecções Hospitalares, em 1998, que tem por objetivo reduzir a incidência e a gravidade das infecções hospitalares por meio da qualificação da assistência hospitalar e da vigilância sanitária (MS, 1998); 2) o estabelecimento da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, em 2006 pelo Ministério da Saúde e pela ANVISA, com o objetivo de ampliar a detecção, prevenção e controle da emergência de resistência nos serviços de saúde brasileiros (OPAS, 2005); 3) regulamentação da venda de antimicrobianos para uso humano, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº20 de 2011 (ANVISA, 2011); 4) o reconhecimento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como órgão responsável pela regulamentação do registro, fabricação, comércio, e uso de antimicrobianos em animais, no ano de 1969 (Brasil, 1969). Por sua vez, o MAPA implementou, dentre outras medidas, a regulamentação da utilização de produtos de uso veterinário contendo antimicrobianos para alimentação animal por meio da Instrução Normativa nº 65/2006 (MAPA, 2006) e o Programa Nacional de Controle de Patógenos, que visa monitorar e gerenciar o risco e a presença de patógenos de origem animal em alimentos (MAPA, 2017).

Quanto ao gênero *Enterococcus*, nos anos de 1970 e 1990, foram registrados dois grandes marcos de infecções enterocócicas em amostras clínicas nos Estados Unidos. A primeira associada ao uso de cefalosporinas, em tratamento direcionado a *E. faecalis*, e a segunda causada por *E. faecium*, muito mais associado à sua resistência à vancomicina e penicilina. Desde então, a crescente ocorrência de enterococos resistente a antibióticos em amostras clínicas gera preocupação, em especial as cepas de enterococos resistentes à vancomicina (da sigla em inglês,

Vancomycin-Resistance Enterococcus - VRE), que também apresentam resistência a penicilina e alto nível de resistência a aminoglicosídeos, encontradas no mundo todo (Arias & Murray, 2012; Gilmore et al., 2014; Goossens, 2018).

É sabido que em amostras clínicas os *Enterococcus* spp. possuem mecanismos intrínsecos que lhe conferem redução na suscetibilidade a algumas classes de antimicrobianos. Além disso, sua alta propensão a adquirir e expressar novos fatores determinantes os tornam ainda menos suscetíveis aos fármacos utilizados atualmente (Arias & Murray, 2012; Campos et al., 2013).

Além de tais mecanismos intrínsecos, é importante considerar também a presença de conjuntos de genes que conferem redução na sensibilidade a antimicrobianos encontrados no ambiente, definidos como resistoma ambiental. Mesmo antes do uso de antimicrobianos em tratamentos clínicos, bactérias desenvolveram genes que, muito além de conferir redução na sensibilidade a antimicrobianos, possuem função original de oferecer para o microrganismo alguma defesa contra toxinas ou compostos naturalmente encontrados no ambiente onde estão inseridas (Sengupta et al. 2013; Poole, 2005).

Considerando-se que o tratamento com antimicrobianos é um método utilizado em larga escala e, em muitos casos clínicos, o único tratamento eficiente no combate de infecções, é imperativo que mais estudos sejam realizados com o maior grau de detalhamento possível acerca dos fatores de redução da sensibilidade a antimicrobianos e virulência em enterococos, visando combater e prevenir futuras infecções de forma assertiva e eficiente (Palmer et al., 2010; Lee et al., 2019).

3.3.2 Redução de suscetibilidade aos β -Lactâmicos

Naturalmente os enterococos apresentam baixos níveis de redução de sensibilidade intrínseca aos antimicrobianos β -Lactâmicos, a exemplo de penicilina, ampicilina, piperacilina e imipenem. São moléculas eficientes que atuam diretamente sobre as proteínas responsáveis pela síntese de peptidoglicano, entretanto, por atuar como bacteriostático em enterococos, esta classe de antimicrobianos é utilizada convencionalmente em associação a bactericidas sinérgicos em casos de infecções graves como endocardite ou meningite (Garrido et al., 2014).

A redução da sensibilidade intrínseca dos enterococos a penicilina está associada a expressão de uma proteína ligante de penicilina (do inglês *Penicillin-*

Binding proteins, PBPs) de baixa afinidade (denominada PBP5 em *E. faecium* e algumas vezes PBP4 em *E. faecalis*) que se liga fracamente aos antibióticos β -lactâmicos. O elevado nível de redução de sensibilidade a este antimicrobiano está associado a mutações nestas proteínas de ligação, tornando-as menos suscetíveis à inibição pelo antimicrobiano (Tang et al., 2014).

A produção de β -lactamases, que atuam inativando o antibiótico através da hidrólise do anel β -lactâmico, é outro mecanismo associado a redução da sensibilidade a elevados níveis de β -lactâmicos. Os genes para produção de β -lactamases em *Enterococcus* spp. podem estar localizados tanto no plasmídeo quanto no cromossomo e são facilmente transferidos para outros microrganismos (inclusive para outros gêneros como *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp.), dentre eles, uma grande variedade de genes de resistência e múltiplas β -lactamases de diferentes classes funcionais (Bush, 2010).

3.3.3 Redução da sensibilidade aos Aminoglicosídeos

Desde 1940, com a sua introdução na clínica, aminoglicosídeos tem sido uma parte importante no combate a infecções devido ao seu espectro de atividade, bactericida rápida e química favorável. A estreptomicina foi o primeiro aminoglicosídeo eficiente contra a tuberculose. Hoje em dia, a estreptomicina ainda é usada em conjunto com outros antimicrobianos para utilização com efeito sinérgico para tratamento de brucelose, endocardite causadas por enterococos, tularemia e outras infecções causadas por *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp. (Ramirez & Tolmasky, 2010).

O mecanismo de ação deste antimicrobiano está relacionado a sua capacidade de penetrar na célula e interferir na síntese de proteínas estruturais. Como resultado da ligação do aminoglicosídeo aos sítios aniônicos na membrana externa, os cátions bivalentes que cruzam as moléculas de lipopolissacarídeos adjacentes são deslocados, resultando em um aumento na permeabilidade fazendo com que ocorra a penetração "autopromovida" (do inglês *self-promoted uptake*) de moléculas de aminoglicosídeos para o espaço periplasmático. Do espaço periplasmático a molécula entra para dentro do citoplasma e chega ao seu alvo celular, os ribossomos, onde tem a capacidade de induzir erros de incorporação de aminoácidos durante a síntese proteica (Ramirez & Tolmasky, 2010).

Enterococos possuem baixa permeabilidade celular a estas moléculas, reduzindo sua suscetibilidade a baixas concentrações desde grupo de antimicrobianos (Ramirez & Tomalsky, 2010; Garrido et al., 2014; Huff, 2018). Há, entretanto, diversos mecanismos de redução da sensibilidade que podem ou não coexistir simultaneamente dentro da mesma célula que incluem: 1) modificação do alvo por mutações no gene *16S RNAr* ou proteínas ribossomais; 2) metilação do *16S RNAr*; 3) redução da permeabilidade por modificação nas membranas celulares; 4) eliminação das moléculas do fármaco através de bombas de efluxo; e 5) inativação enzimática da molécula de antimicrobiano (Leclercq et al., 1992; Ramirez & Tomalsky, 2010).

3.3.4 Redução da sensibilidade aos Macrolídeos

Macrolídeos são uma classe de antimicrobianos que atuam ligando-se à subunidade 50S do ribossomo, mais especificamente no domínio V do *23S RNAr*, bloqueando a síntese de proteínas (Gomes et al., 2016). Esta não é uma classe de fármacos usualmente utilizada para o tratamento de *Enterococcus* spp., entretanto, alguns macrolídeos, como a azitromicina, tem demonstrado potencial para o tratamento de infecções, com excelentes parâmetros clínicos (Portillo et al., 2000; Gomes et al., 2016).

Derivados da eritromicina tem-se mostrado eficiente no tratamento de infecções em modelos animais como sepse e pielonefrite, servindo como anti-inflamatório e imunomodulatório. O uso veterinário de macrolídeos é realizado em grande escala para o tratamento tanto de animais, de pets a rebanhos, assim como promotor de crescimento. Esta prática elevou os níveis de redução de sensibilidade à antimicrobianos durante mais de duas décadas e, mesmo com as proibições realizadas para mitigar o problema, o uso ilegal dos antimicrobianos continua sendo reportado (Sheridan et al., 2014).

A redução da sensibilidade a eritromicina foi relatada primeiramente em *Staphylococcus* sp. em 1952. Apesar dos mecanismos intrínsecos de redução da sensibilidade de enterococos à maioria dos macrolídeos, em função da sua natureza hidrofóbica, diferentes mecanismos têm sido descritos tais como alterações de alvo ou de bombas de efluxo e outros mecanismos de redução de suscetibilidade que podem ser compartilhados entre os microrganismos em elementos gênicos transferíveis. Ainda, estudos apontam que a presença de metais pesados ou de traços

de antibióticos no ambiente, podem levar a um aumento na taxa de mutabilidade dos microrganismos e também como mediadores de mecanismos transferíveis de redução de sensibilidade a macrolídeos (Stepanhauskas et al., 2006; Vien et al., 2012).

Os principais genes envolvidos no mecanismo de redução de sensibilidade à eritromicina são *ermA*, *ermB*, *ermC* e *ermTR*, que codificam metiltransferases, e os genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC* e *mreA*, que codificam as bombas de efluxo responsáveis pela retenção da molécula de antimicrobiano da célula bacteriana (Garrido et al., 2014; Huff, 2018).

3.3.5 Redução de sensibilidade à Quinolonas

As quinolonas são utilizadas na clínica humana desde 1962, mas a partir dos anos de 1980, passou a ser uma classe amplamente utilizada em infecções urinárias em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) com o desenvolvimento da sua segunda geração, as fluoroquinolonas (Correia et al., 2017). Depois de décadas de uso, a ciprofloxacina continua sendo uma das drogas mais comumente prescritas por médicos para tratamentos infecciosos e, ainda, citada como um dos antimicrobianos mais importantes pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Collignon et al., 2016; OMS, 2015).

As quinolonas atuam inibindo a atividade de duas topoisomerasas e da DNA girase, enzimas essenciais para os processos de empacotamento e replicação do genoma, durante a replicação celular bacteriana (Garrido et al., 2014). Os mecanismos de redução da suscetibilidade a antimicrobianos associados a quinolonas são principalmente: 1) mutações cromossomais, que alteram o alvo do fármaco e sua afinidade ao ligante; 2) mutações que levam a alteração da permeabilidade da membrana celular, reduzindo a concentração da droga no meio celular; ou ainda 3) através de plasmídeos que expressam bombas de efluxo para retirada da droga do interior da célula (Correia et al., 2017).

Os principais genes associados à redução de suscetibilidade a quinolonas em enterococos são *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*. (Garrido et al., 2014; Correia et al., 2017).

3.3.6 Redução de sensibilidade à Glicopeptídeos

Este grupo de antimicrobianos atua inibindo a síntese de parede celular de bactérias. A vancomicina é um dos fármacos mais importantes deste grupo, utilizado também em infecções causadas por bactérias multirresistentes. Seu mecanismo de ação atua inibindo a biossíntese da parede celular, proveniente da ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina do ácido N-acetilmurâmico e, conseqüentemente, impedindo a sua incorporação à estrutura da parede celular (Kristich et al., 2014).

O mecanismo de redução de sensibilidade em enterococos associado a esta classe está relacionado aos genes que diminuem a afinidade dos precursores aos antimicrobianos, levando à síntese normal da parede celular (Shepard & Gilmore, 2002). Hoje em dia, 30% das infecções por *E. faecalis* são provocadas por cepas que apresentam redução de sensibilidade à vancomicina. Acredita-se que a transferência horizontal de genes entre *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus* pode ter contribuído para este fato (Nebreda et al., 2007; Werner et al., 2008; Zhu et al., 2010; Fernandes et al., 2015).

São descritos nove genes de resistência a glicopeptídeos, seis deles adquiridos através de plasmídeos e transposons (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanE*, *vanG* e *vanL*), e um gene cromossomal (*vanC*) (Miller et al., 2014).

3.3.7 Resistência as Tetraciclínas

A tetraciclina é um antimicrobiano de amplo espectro, utilizado no tratamento de uma grande variedade de bactérias gram-positivas, gram-negativas, aeróbias, anaeróbias e ainda alguns protozoários. Atua como bacteriostático, entretanto, em altas concentrações, age como bactericida. Seu mecanismo de ação é similar aos aminoglicosídeos, através da inibição de síntese proteica, ligando-se a subunidade 30S ribossomal, prevenindo a associação do RNA transportador ao ribossomo bacteriano (Chopra & Roberts, 2001).

A maioria dos mecanismos de redução da suscetibilidade à tetraciclina ocorrem através da aquisição de plasmídeos, apesar de poder ocorrer através de mutações no DNA cromossomal. Outro mecanismo de redução de suscetibilidade se dá através da inibição do transporte do fármaco no interior da célula ou através do aumento do efluxo das moléculas de antimicrobianos. Atualmente, 33 genes que

conferem redução na suscetibilidade à tetraciclina são conhecidos (genes *tet*), em *Enterococcus* spp. os mais frequentemente relatados são *tetL*, associado à codificação de proteínas da bomba de efluxo e *tetM* e *tetS*, que conferem proteção ao ribossomo da célula bacteriana (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2002; Frazzon et al., 2010)

Por ser útil na agricultura, a tetraciclina foi amplamente utilizada como promotora de crescimento em animais de criação. No contexto da alta taxa de transferência de plasmídeos entre os microrganismos e da transferência de mecanismos que conferem redução na suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos entre animais de consumo e seres humanos, acredita-se que o uso em larga escala da tetraciclina pode ter contribuído para a seleção de bactérias resistentes (Roberts & Schwartz, 2016).

3.4 Fatores de virulência em *Enterococcus* sp.

Diversos fatores de virulência são encontrados em *Enterococcus* spp., auxiliando-os a colonizar o hospedeiro, adaptando-se ao ambiente onde estão inseridos e permitindo a evasão de defesas do organismo. Tais fatores conferem a habilidade de colonizar o trato gastrointestinal como seu habitat natural, permitir e aprimorar sua aderência à superfície extracelular, formar biofilme e produzir enzimas degradadoras de colágeno ou hidrolisadoras de hemácias. A maioria das infecções de maior risco ao hospedeiro são causadas pela translocação destes microrganismos virulentos, levando à sua colonização em tecidos onde não ocorrem naturalmente (Franz & Phillips, 1999).

3.4.1 Substância de agregação - *agg*

A substância de agregação, codificada pelo gene *agg*, está presente na superfície da célula de *E. faecalis*, é um dos fatores que contribui para o seu potencial patogênico, permitindo a adesão da célula bacteriana às células eucariontes (Medeiros, 2011). Entretanto, também são de extrema importância para o processo de conjugação bacteriana, atuando como mediadores do contato entre o micro-organismo doador e o receptor, possibilitando a transferência de plasmídeos. (Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004). A sua expressão permite a formação de grandes agregados e está relacionada ao aumento da hidrofobicidade da superfície celular das espécies de *Enterococcus*. (Fisher & Phillips, 2009).

3.4.2 Adesina de colágeno - *ace*

A adesina de colágeno, codificada pelo gene *ace*, é uma proteína de superfície celular presente em *E. faecalis*, pertencente à família dos componentes de superfície microbiana de reconhecimento de molécula de matriz adesiva (MSCRCRAMM) (Fisher & Phillips, 2009). Sua função é associar as bactérias a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, sendo este uma parte do primeiro passo que leva ao processo de manifestações clínicas de infecções. Para microrganismos como *E. faecalis*, a expressão deste tipo de proteína permite a sua aderência à tecidos cartilagosos com máxima facilidade. Murray e colaboradores (1990) afirmam que o *E. faecalis* é apontado como um dos causadores mais comuns de endocardites desde 1900, desempenhando papel de destaque como um dos patógenos oportunistas conhecidos que mais geram infecções nosocomiais graves, devido ao potencial de virulência desta proteína (Rich et al., 1999).

3.4.3 Citolisina - *cyIA*

A citolisina é a única toxina bacteriana conhecida atualmente capaz de lisar células de origem procariótica e eucariótica em um único sistema, devido suas propriedades β -hemolítica e bactericida (Coburn & Gilmore, 2003; Fisher & Phillips, 2009).

O *operon* da citolisina foi encontrado em plasmídeos, assim como em ilhas de patogenicidade no cromossoma de algumas cepas de *E. faecalis* (Shankar et al., 2003). Tal *operon* é composto por oito genes *cyR1*, *cyR2*, *cyLS*, *cyLL*, *cyM*, *cyB*, *cyIA* e *cyI* e regulado através do mecanismo de *quorum-sensing*. (Coburn e Gilmore, 2003; Huff, 2018), o gene *cyIA* codifica a enzima citolisina.

A síntese dessa enzima representa maior disponibilidade de nutrientes para a bactéria excretora, por possibilitar acesso a nutrientes chave não disponíveis para microrganismos não produtores de citolisina (Coburn & Gilmore, 2003). Da mesma forma, há vantagem na competição por nutrientes com os demais microrganismos. Ainda, a citolisina tem sido relatada como um dos mais importantes mecanismos determinantes da letalidade em casos de endocardite humana (Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2003).

3.4.4 Proteína de superfície de enterococos - *esp*

A formação de biofilmes foi identificada como uma das maiores causas de doenças nosocomiais. Sua estrutura é formada por comunidades bacterianas fixadas

em um substrato e envoltas em uma matriz que protege os microrganismos do meio ambiente onde estão inseridos. A proteína de superfície de enterococos, codificada pelo gene *esp*, é relatada como o principal promotor da formação de biofilme no gênero *Enterococcus*, inserido em uma grande ilha de patogenicidade, que é responsável pela produção de proteínas de superfície extracelular que permitem a adesão, colonização e evasão do sistema imune do hospedeiro pelo microrganismo, permitindo a sua persistência durante a infecção (Toledo-Arana et al., 2001).

O gene *esp* tem sido utilizado como marcador para identificação de cepas de *E. faecium* altamente resistentes à vancomicina em pacientes hospitalizados (Willems et al., 2001) e apontado como um dos grandes promotores da capacidade de formação de biofilme em *E. faecalis* originados de infecções nosocomiais (Tendolkar et al., 2004).

3.4.5 Gelatinase - *gelE*

A gelatinase é uma enzima da classe de metaloproteases capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, fibrina, hemoglobina e caseína (Kayaoglu & Orstavik, 2004; Park et al., 2007). É codificada pelo gene *gelE* e sua atividade permite a formação de biofilmes e obtenção de nutrientes através da hidrólise do colágeno em subcomponentes como peptídeos, polipeptídeos e aminoácidos (Elavarashi et al., 2017).

É relatado que cepas de *Enterococcus* spp. capazes de produzir as proteínas gelatinase e *esp*, possuem atividade aumentada quanto a produção de biofilmes. (Aladarose et al., 2019).

4 MATERIALE MÉTODOS

4.1 Coletas

Foram analisadas nove amostras de suabes retais e quatro de suabes orais de graxains-do-campo (*L. gymnocercus*) ou gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) capturados pelos técnicos responsáveis da área de mastofauna da empresa MAURIQUE Consultoria Ambiental SS (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição das amostras coletadas de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande.

Espécie	Identificação	Local de Coleta	Origem	Sexo	Ponto de Coleta	Data de coleta
<i>Leopardus geoffroyi</i>	CM1	Candiota	suabe retal	F	1	11/04/2016
	CM6*	Arroio Grande	suabe retal	F	6	06/10/2017
	CM8***	Arroio Grande	suabe retal	M	8	05/10/2017
	CM9	Arroio Grande	suabe oral	F	9	07/10/2017
	CM10	Arroio Grande	suabe retal	M	10	08/10/2017
	CM11*	Arroio Grande	suabe oral	F	6	06/10/2017
	CM13***	Arroio Grande	suabe oral	M	8	05/10/2017
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	CM2	Candiota	suabe retal	M	2	10/12/2016
	CM3	Candiota	suabe retal	F	3	15/12/2016
	CM4	Candiota	suabe retal	M	4	15/12/2016
	CM5	Candiota	suabe retal	M	5	13/12/2016
	CM7**	Arroio Grande	suabe retal	M	7	06/10/2017
	CM12**	Arroio Grande	suabe oral	M	7	06/10/2017

Os asteriscos correspondentes representam amostras provenientes dos mesmos animais.

Foram estabelecidos cinco pontos de coleta em dois fragmentos do Bioma Pampa, totalizando 10 pontos, localizados em áreas rurais na mesorregião Sudeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre os meses de abril de 2016 e outubro de 2017. Um dos fragmentos está localizado no município de Candiota (Latitude 31°33'06.73" S, Longitude 53°40'40.63" O), no distrito de Seival. O segundo fragmento de campo sulino utilizado no estudo está localizado no município de Arroio Grande (Latitude 32°13'58.99" S, Longitude 53°05'11.75" O (Figura 5).

Todos os animais amostrados neste estudo eram selvagens, com coleta autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), licença sob o número 0200 1.007 9 10 12006-32. A manipulação dos animais foi realizada pelos técnicos responsáveis da área de mastofauna da



Figura 6 - Processo de manipulação de um gato-do-mato-grande (esquerda) e um graxaim-do-campo (direita) para a coleta das amostra. Fonte: Felipe Peters.

As amostras foram retiradas a partir do reto e da cavidade oral dos animais com o auxílio de suabes estéreis e luvas, armazenados em meio de transporte Stuart (KASVI, Paraná, Brasil) (ANVISA, 2014) e transportadas até o Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Pontos de coleta 1 a 5: Candiota - RS

O município de Candiota está situado na região sudeste do estado, a 387 km de distância da capital. O município apresenta densidade demográfica de 10,03 hab./km², com 9.362 habitantes e área total de 933,834 km². Comporta 73.234,754 hectares de área destinada a estabelecimentos agropecuários (definido pelo IBGE como terrenos de área contínua formada por uma ou mais parcelas, subordinados a um único produtor, onde se processe o cultivo do solo com culturas permanentes ou temporárias, incluindo hortaliças e flores, silvicultura, reflorestamento e extração de produtos vegetais, assim como a criação ou engorda de animais de pequeno, grande e médio porte), o correspondente a 78,4% de sua área total. A atividade pecuária do município é baseada em criação de gado leiteiro e em ovinocultura. Possui a agricultura fortalecida pela produção de sementes oleícolas e agroecológicas; está em processo de desenvolvimento no cultivo de soja e possui forte produção de arroz e uva. Em razão de seu subsolo rico em carvão e calcário, o município possui como principal característica econômica a geração de energia termoelétrica, aspirante a tornar-se a grande potência energética do país. Atualmente há três grandes empresas termoelétricas mineradoras de carvão mineral em atividade na cidade e uma fábrica cimenteira pertencente a um dos maiores grupos do mercado mundial.

As coletas foram realizadas em cinco pontos a 15,36 km de distância do centro da cidade de Candiota, nas proximidades do Rio Jaguarão, às margens de um lago (Figura 7). Nas proximidades deste local, há uma grande atividade mineradora e agrícola.

As amostras coletadas nestes pontos foram identificadas como CM1, CM2, CM3, CM4 e CM5. A amostra CM1 era um suabe retal coletada de um gato-do-mato-grande e CM2, CM3, CM4, CM5 eram suabes retais de graxains-do-campo.

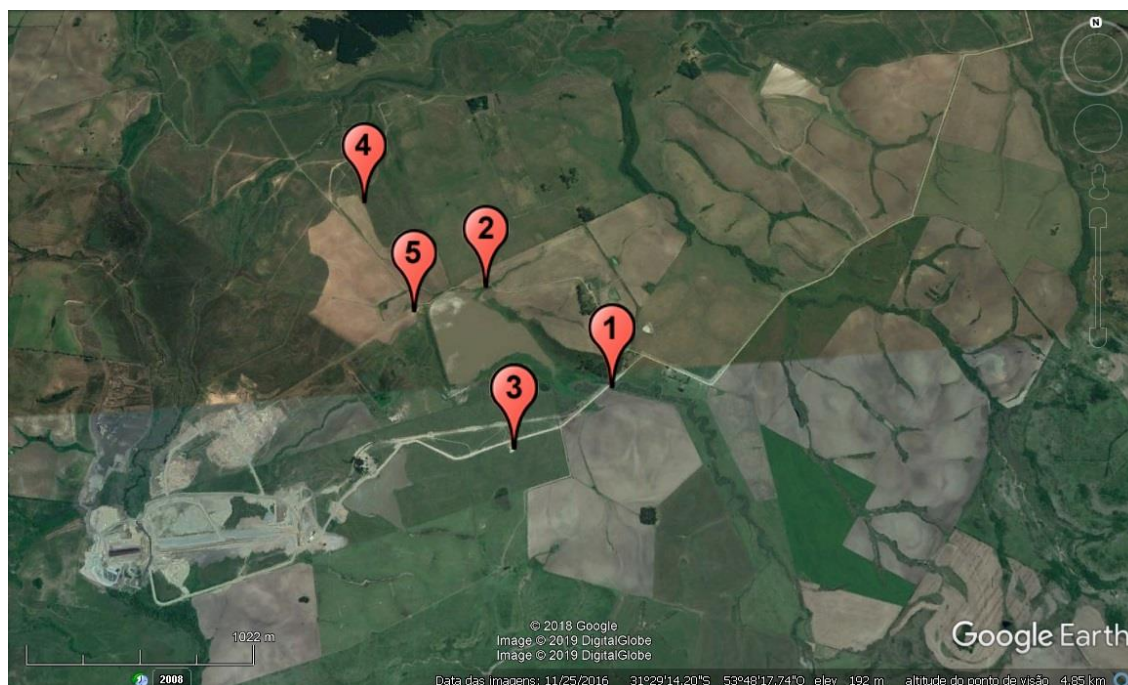


Figura 7 - Pontos de coleta em Candiota -RS. Coordenadas: 1) La 31°28'51.85\"S, Lo 53°48'23.22\"O; 2) La 31°28'34.28\"S, Lo 53°48'45.61\"O; 3) La 31°29'00.60\"S, Lo 53°48'41.70\"O; 4) La 31°28'18.52\"S, Lo 53°49'8.32\"O; 5) La 31°28'37.62\"S, Lo 53°48'59.23\"O.

4.3 Pontos de Coleta 6 a 10: Arroio Grande

Localizado a 345 km de distância da capital do estado, o município de Arroio Grande possui área total de 2.518,480 km², 18.935 habitantes e densidade populacional de 7,52 hab./km². É dividido em oito bairros em área urbana e quatro distritos rurais. Abriga 216.768,927 hectares de área destinada a estabelecimentos agropecuários que ocupam 86% de seu território.

A produção agrícola do município é baseada no cultivo de arroz em casca, que ocupa 451.144 hectares de plantações e, em menor escala, é realizado o cultivo de sementes de trigo, milho e soja. A criação de bovinos e ovinos são predominantes na pecuária do município, sendo a produção de leite o destino principal para as suas 97.707 cabeças de gado, segundo o censo agropecuário do IBGE de 2017.

Foram estabelecidos cinco pontos de coleta, a aproximadamente 18,5km de distância do centro urbano da cidade (Figura 8). Três pontos estão localizados em matas ciliares, próximas ao arroio que dá nome a cidade, Arroio Grande. Os dois pontos restantes estão localizados em fragmentos de mata próximos a fazendas e campos recortados por atividade humana. A aproximadamente 25 km de distância dos pontos de coleta encontra-se a Reserva Biológica de Mato Grande, de extrema importância para a conservação de animais endêmicos do bioma Pampa, incluindo o gato-do-mato-grande.

As amostras coletadas nestes pontos foram identificadas como CM6, CM7, CM8, CM9 e CM10. Conforme a nota abaixo da Tabela 1 as amostras CM8 (suabe retal) e CM13 (suabe oral) foram coletas do mesmo animal, assim como CM9 (suabe retal) e CM10 (suabe oral); e CM6 (suabe retal) e CM11 (suabe oral). Apenas um graxaim-do-campo foi capturado em Arroio Grande e deste animal foi coletado material retal e oral, sendo as amostras etiquetadas com os códigos CM7 e CM12, respectivamente.

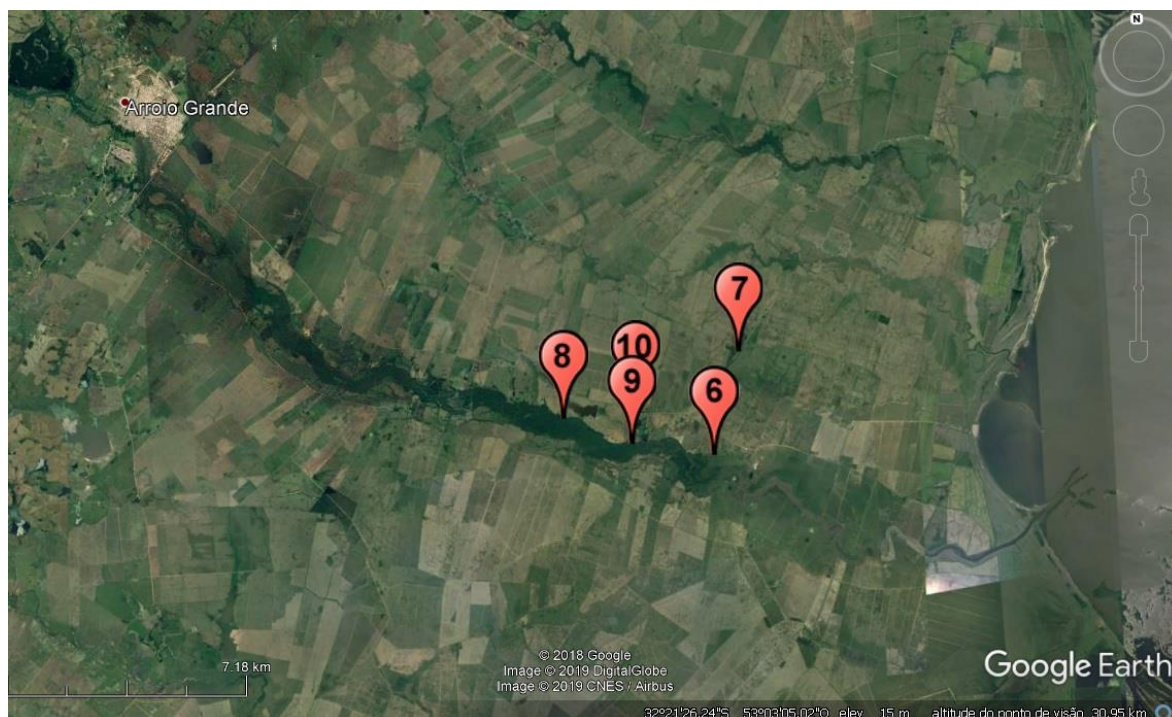


Figura 8 - Pontos de coleta em Arroio Grande – RS. Coordenadas: 6) La 32°20'8.14"S, Lo 52°54'21.17"O; 7) La 32°18'29.75"S, Lo 52°53'47.53"O; 8) La 32°19'25.90"S, Lo 52°57'10.79"O; 9) La 32°19'53.55"S, Lo 52°55'54.17"O; 10) La 32°19'20.29"S, Lo 52°55'48.11"O.

4.4 Isolamento de *Enterococcus* sp.

Para isolamento de *Enterococcus* sp., foi utilizada a metodologia descrita por Cassenego (2011) e Nachtingall (2013) com algumas modificações. As amostras foram incubadas em água peptonada tamponada (Himedia) para pré-enriquecimento não seletivo a 35 °C ±1 °C durante 24 horas. Uma alíquota dessa suspensão foi inoculada em Caldo Azida Dextrose (Himedia) e incubada a 35 °C ±1 °C durante 24 horas.

O isolamento foi realizado pela técnica em que 0,1 mL do caldo azida previamente cultivado foi disposto através do método de espalhamento em superfície (*spread plate*) em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI ágar) (Oxoid) contendo 6,5% de NaCl, em triplicatas, e incubada a 35 °C ±1 °C durante 48 horas. Foram selecionadas entre 7 a 20 unidades formadoras de colônia para análise utilizando-se o critério de morfologia de colônia para seleção. Estas foram semeadas em ágar Bile Esculina (Himedia) e incubadas a 35 °C ±1 °C durante 24 horas.

As colônias que apresentaram características morfológicas para o gênero pesquisado, onde as colônias são 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), foram repassadas para caldo e ágar BHI. As placas e os tubos foram incubadas a 35 °C ±1 °C durante 24 horas.

Após crescimento das colônias nas placas, foram realizados os testes de coloração de Gram e catalase. O crescimento bacteriano no caldo BHI foi para a extração de DNA total pelo método de lise térmica (Donato, 2007). Para tal, 1,5 mL do caldo foi centrifugado a 14.000 rpm e o pellet foi submetido a tratamento com uma solução alcalina contendo SDS (dodecyl sulfato de sódio – um detergente removedor de lipídeos da membrana celular), seguido por tratamento com tampão TE contendo 10 mM de Tris como estabilizante de pH e EDTA para sequestrar o cálcio e o magnésio, possibilitando a preservação do genoma.

A concentração de DNA e o grau de pureza das amostras foi mensurado através do Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer, utilizando-se a razão 260/280.

Todos os isolados foram armazenados em microtubos a -20 °C em uma solução contendo 1 mL de meio para preservação (solução de 10% de leite desnatado e 10% glicerol) junto à uma alíquota da cultura bacteriana isolada (Cody et al., 2008).

4.5 Identificação do gênero enterococos pela Reação em Cadeia da Polimerase –PCR

A identificação do gênero *Enterococcus* nas amostras de DNA extraída de cultivos celulares bacterianos foi confirmada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o termociclador 2720 (Applied Biosystems®) e nucleotídeos iniciados gênero específico: 5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' e 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3' (Ke et al., 1999), referentes à amplificação do gene *tuf*, que codifica o fator de alongamento EF-Tu encontrado em um dos operons mais conservados na evolução de procariotos (Putzer & Laalami 2013). Para verificação, foi utilizado como controle positivo a cepa de *Enterococcus 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 (QuatroG®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (QuatroG®), 200 µM de dNTPs (Quatro®), 1U de Taq DNA polimerase (QuatroG®) e água Mili-Q 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 s a 95°C, 30 s a 54°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 10 µL de cada amostra em um gel de agarose em concentração de 1,5%, dissolvido em tampão tris-acetato-EDTA 1x (TAE) e corado com syber safe. Aplicadas no gel, as amostras foram submetidas a uma tensão de 50 volts e 80 mA por 75 m para 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 com tamanho aproximado de 111 pares de base.

4.6 Identificação das espécies usando 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., previamente identificados a nível de gênero, de acordo com o protocolo previamente descrito por Sauget e colaboradores (2017). Portanto, foi realizado o crescimento bacteriano das amostras em placa de BHI ágar, incubado por 24 h em estufa a 35°C. As colônias bacterianas foram suspensas em 300 µL de água Milli-Q e adicionado 900 µL de etanol absoluto. A mistura foi agitada e posteriormente centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 µL de ácido fórmico (70% v/v). A esta mistura foram adicionados 50 µL de acetonitrila, procedeu-se então a centrifugação a 10.000 rpm durante 2 minutos e 1 µL do sobrenadante foi transferido para a placa de metal do equipamento de MALDI-TOF. Após a secagem do material na placa, foi adicionado 1 µL de α-cyano-hydroxycinnamico (Bruker Daltonik Gmgh) sobre o sobrenadante seco. Para calibrar o equipamento foi utilizada a cepa *Escherichia coli* 1917 Nissle, assim como para uso de controle positivo das amostras. A análise MALDI-TOF foi realizada utilizando um microflex LT Bruker espectrômetro de massa (Bruker Daltonik GmbH) e identificados automaticamente através do programa BrukerBioTyper®1.1.

A cada amostra foi atribuída uma classificação em razão do score apresentado, sendo a identificação altamente provável a nível de espécies indicada com range entre 2300 e 3000; a identificação segura do gênero, porém, apenas provável a nível de espécie é indicada com range entre 2.000 e 2.299; a identificação provável a nível de gênero é classificada com range entre 1.700 e 1.999 e, por fim, em caso de identificação não realizável, o range atribuído está entre 0.000 e 1.699.

As cepas de *Enterococcus casseliflavus* selecionadas neste estudo não foram identificadas através do MALDI-TOF, pois apresentaram range entre 0.000 e 1.699. Para estas, foi utilizada a técnica de PCR para a identificação a nível de espécie através de oligonucleotídeos espécie-específicos: 5'-TCCTGAATTAGGTGAAAAAC-3' e 5'-GCTAGTTTACCGTCTTTAACG-3'. Para controle positivo foi utilizado a cepa J21 (Santestevan et al., 2015) e as seguintes condições de temperatura: 94 °C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C

por 1 minuto, 58 °C durante 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72 °C (Jackson et al, 2004).

4.7 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

A determinação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas de enterococos frente aos antimicrobianos foi realizada através do método de disco-difusão (CLSI-2018). Os isolados foram cultivados em BHI por 24 h a 37 °C. Um inóculo de cada amostra bacteriana foi diluído em 5ml de solução salina na concentração de 0,85% de cloreto de sódio e a turvação foi ajustada para o padrão da escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Cada suspensão contendo o inóculo foi semeada em placa, de acordo com o método de espalhamento em superfície (spread-plate), contendo ágar Müller-Hinton (Müller-Hinton Agar, Acumedia®, Neogen, Michigan) com o auxílio de suabe. Os antimicrobianos foram distribuídos na superfície do ágar Mueller Hinton (Kasvi), respeitando a distância de 24 mm de distância centro a centro entre os discos impregnados com antimicrobianos, pressionando-os levemente para adesão ao ágar.

Os antimicrobianos testados foram (concentração expressa em µg ml⁻¹): ampicilina -AMP (10), vancomicina- VAN (30), eritromicina-ERI (15), tetraciclina-TET (30), ciprofloxacina-CIP (5), norfloxacina-NOR (10), nitrofurantoína-NIT (300), cloranfenicol-CLO (30), gentamicina-GEN (120), linezolid-LNZ (30), rifampicina-RIF (5) e estreptomicina-EST (300).

Uma vez inoculadas e adicionado os antimicrobianos, as placas foram incubadas a 35 °C durante 18 a 24 horas. O diâmetro dos halos de inibição de crescimento foi medido e as amostras foram classificadas como sensível (S) e sensibilidade reduzida (SR), através das faixas de interpretação previamente estabelecidas para *Enterococcus* sp. (CLSI, 2018).

Foram considerados multirresistentes as cepas que apresentaram sensibilidade reduzida a mais de dois antimicrobianos da mesma classe.

4.8 Detecção de genes de resistência para *Enterococcus* sp.

Todas as amostras que apresentaram suscetibilidade reduzida (SR) a eritromicina e tetraciclina foram selecionadas para a caracterização genética do mecanismo de virulência correspondente. Por meio da técnica de PCR convencional,

foram testados os genes *ermB* e *msrC*, para os isolados com SR a eritromicina, e os genes *tetL*, *tetM* e *tetS* para os isolados com SR a tetraciclina. As reações foram amplificadas de acordo com as condições da tabela (Tabela 2). As sequências das bases de DNA de cada oligonucleotídeo iniciador está demonstrada na Tabela 3. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador TX96 (Amplitherm®), com volume total de 25 µL, 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação Taq DNA polimerase (QuatroG®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeos iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (QuatroG®), 200 µM de dNTPs (QuatroG®), 1U de Taq DNA polimerase (QuatroG®) e água Milli-Q estéril para completar o volume da reação.

Tabela 2 - Condições de amplificação utilizadas para genes de resistência *ermB*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	T	°C	T	°C	T	°C	T		°C
<i>ermB</i>	3min	93	40	1min	93	1min	54	1min	72	5min	72	Sutcliffe et al. (1996)
<i>msrC</i>	5min	94	35	1min	94	1min	51	1min	72	5min	72	Werner et al. (2001)
<i>tetL</i>	5min	94	35	1min	94	1min	63	1min	72	5min	72	Frazzon et al. (2010)
<i>tetM</i>	5min	95	35	1min	94	1min	53	1min	72	5min	72	Aarestrup et al. (2000)
<i>tetS</i>	5min	96	36	1min	95	1min	57	1min	73	5min	73	Choi & Woo (2015)

min: minutos

Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes *ermB*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*.

Primer	Gene	Sequência	Fragmento (pb)	Controle positivo	Referência
<i>ermB</i> F	<i>ermB</i>	GAAAAGGTACTIONCAACCAAATA	645	485 (Medeiros, 2011)	Sutcliffe et al. (1996)
<i>ermB</i> R		AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
<i>msrC</i> F	<i>msrC</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG	342	P6.7 (Prichula, 2015)	Werner et al. (2001)
<i>msrC</i> R		GTAACAAAATCGTTCCCCG			
<i>tetL</i> F	<i>tetL</i>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC	627	P4.1 (Prichula, 2015)	Frazzon et al (2010)
<i>tetL</i> R		TGTAACCTCCGATGTTTAACACG			
<i>tetM</i> F	<i>tetM</i>	GTTAAATAGTGTCTTGGAG	656	P6.7 (Prichula, 2015)	Aarestrup et al. (2000)
<i>tetM</i> R		CTAAGATATGGCTCTAACAA			
<i>tetS</i> F	<i>tetS</i>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT	660	C12 (Medeiros, 2011)	Aarestrup et al. (2000)
<i>tetS</i> R		ACATAGACAAGCCGTTGACC			

pb: pares de bases

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR, foram aplicados 10 µL de cada amostra em um gel de agarose em concentração de 1,5 %, dissolvido em tampão tris-acetato-EDTA 1x (TAE) e corado com tampão de reação com Gel Red (QuatroG). O gel foi submetido a uma tensão de 50 volts e 80 mA por 75 minutos para

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 com pares de base esperados para cada gene, como apresentado na Tabela 3.

4.9 Detecção de genes de virulência em *Enterococcus* sp.

Todos os isolados bacterianos obtidos neste estudo foram submetidas a análises moleculares, para a detecção dos genes de virulência *agg*, *ace*, *cyIA*, *esp* e *geE*, por meio da técnica de PCR convencional (Tabela 4). As sequências das bases de DNA de cada oligonucleotídeo iniciador está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 4 - Descrição das condições de amplificação utilizadas para genes de virulência *ace*, *agg*, *cyIA*, *esp* e *geE*.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	T	°C	T	°C	T	°C	T		°C
<i>ace</i>	5 min	94	35	1 min	94	1 min	57	1 min	72	5 min	72	Mannu et al. (2003)
<i>agg</i>	5 min	94	35	1 min	94	2 min	62	2 min	72	10 min	72	Eaton e Gasson (2001)
<i>cyIA</i>	5 min	94	35	1 min	94	1 min	56	1 min	72	5 min	72	Shankar et al (1999)
<i>esp</i>	3 min	94	40	1 min	94	1 min	60	1 min	72	5 min	72	Eaton e Gasson (2001)
<i>geE</i>	5 min	94	35	1 min	94	1 min	50	1 min	72	5 min	72	Eaton e Gasson (2001)

min: minutos

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

Primer	Gene	Sequência	Fragmento (pb)	Controle positivo	Referência
<i>ace</i> F	<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC	320	C12 (Medeiros, 2011)	Mannu et al. (2003)
<i>ace</i> R		TCTATCACATTCGGTTGCG			
<i>cyIA</i> TE17	<i>cyIA</i>	TGGATG'ATAGTGATAGGAAGT	517	14 (Medeiros, 2011)	Eaton e Gasson (2001)
<i>cyIA</i> TE18		TCTACAGTAAATCTTTCGTC A			
<i>esp</i> 46	<i>esp</i>	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	1198	14.3 (Grassoti, 2018)	Shankar et al. (1999)
<i>esp</i> 47		CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			
<i>geE</i> F	<i>geE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT	402	C12 (Medeiros, 2011)	Eaton e Gasson (2001)
<i>geE</i> R		ACGCATTGCTTTTCCATC			
<i>agg</i> TE3	<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	M2.15 (Grassoti, 2018)	Eaton e Gasson (2001)
<i>agg</i> TE4		AAACGGCAAGACAAGTAAATA			

pb: pares de bases

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) para os genes *cyIA* e *geE*. Para os genes *agg*, *ace* e *esp* foi utilizado o termociclador TX-96 (Amplitherm). O volume total das reações foi de 25 µl, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação para *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia) e água ultrapura estéril para completar o volume da reação (MiliQPlus, Milipore). As condições de temperaturas para os genes de virulência estão descritas na Tabela 4.

Para a visualização dos produtos amplificados foi realizada eletroforese com gel de agarose na concentração de 1,5% diluído em tampão tris-acetato-EDTA (TAE), 10 µL de amplificado por amostra e, para fim de visualização, adicionado 0,5µl de tampão de reação com *Gel Red* (QuatroG) diluído na proporção 1:5. O gel e as amostras nele aplicadas foram submetidos a uma tensão de 50 volts e 80 mA por 75 min para a migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada através do Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia, Molecular Imaging). As amostras que apresentaram fragmentos com pares de base aproximados aos da Tabela 5 foram consideradas positivas.

4.10 Ensaio para verificação da atividade enzimática - gelatinase

As amostras que apresentaram resultado positivo para o gene *geE* foram submetidas a teste fenotípico de atividade da enzima gelatinase, seguindo o protocolo estabelecido por Marra e colaboradores (2007). Um inóculo de cada isolado bacteriano foi transferido para tubos individuais contendo 5 mL de caldo gelatina composto, por 12% de gelatina para microbiologia (Labsynth) e 0,8% de caldo BHI (Himedia), através da técnica de perfuração de ágar. Os tubos foram incubados a 35°C durante 24 horas. As leituras de resultado foram realizadas logo após o resfriamento dos tubos em refrigerador a 4°C, por 30 minutos. As amostras em que o ágar gelatina apresentaram consistência alterada, comparada com o controle negativo (meio de cultura não inoculado), foram consideradas positivas para a produção de gelatinase; amostras que apresentaram consistência semelhante ao controle negativo foram consideradas não produtoras de gelatinase. Neste estudo, a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

4.11 Ensaio para verificação de atividade hemolítica

O teste para atividade hemolítica foi realizado em todas as amostras, positivas ou negativas para o gene *cy/A*, responsável pela produção da enzima hemolítica citolisina. O experimento foi realizado de acordo com a metodologia de Brenden & Janda (1987), no qual as amostras são estriadas em placas de Petri contendo ágar sangue (Himedia). O meio foi enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro na concentração de 5%, inoculado por estrias e incubado em estufa a 35 °C durante 24 horas. As amostras em que o meio de cultivo apresentou zonas de hemólise ao longo das estrias, foram consideradas positivas.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e presença das espécies de *Enterococcus* em amostras orais e fecais de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande

No presente estudo foram isolados um total 114 cepas de *Enterococcus* sp. de 11 amostras. De cada amostra foram selecionadas em média 12 colônias. Das 13 amostras testadas inicialmente, duas (CM6 e CM13) não cresceram bactérias do gênero *Enterococcus*.

Das 114 cepas isoladas, 58 foram obtidas de amostras de graxains-do-campo (*L. gymnocercus*) e 56 de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*). As espécies identificadas foram *E. faecalis* (52,63%; n=60) *E. faecium*, (25,46%; n=29), *E. casseliflavus* (13,15%; n=15), *E. hirae* (7,01%; n=8), e *E. durans* (1,75%; n=2). O resultado obtido consta na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado do isolamento de *Enterococcus* sp. de amostras de graxaim-do-campo e gatos-do-mato-grande.

Animal	Amostra (n de isolados)	Número de espécies (%)	Número total de isolados
Graxaim-do-campo	Fecal (43)	2 <i>E. durans</i> (4,65)	58
		24 <i>E. faecalis</i> (55,81)	
		17 <i>E. faecium</i> (39,53)	
Oral (15)	15 <i>E. casseliflavus</i> (100)		
Gato-do-mato-grande	Fecal (44)	36 <i>E. faecalis</i> (81,2)	56
		8 <i>E. hirae</i> (27,3)	
		12 <i>E. faecium</i> (100)	

5.1.1 *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais e oral de graxains-do-campo (*L. gymnocercus*)

Dos 58 enterococos provenientes das seis amostras de graxains-do-campo, 43 foram isolados de suabes retais (CM2, CM3, CM4, CM5 e CM7) e 15 isolados de suabe oral (CM12) (Tabela 7).

A espécie mais frequente identificada nos suabes retais CM2, CM3, CM4, CM5 e CM7 foi *E. faecalis*, (55,81%; n=24), seguida por *E. faecium*, (39,56%; n=17) e, *E. durans* (4,65%; n=2). Da amostra CM12, de origem oral, foi isolado somente *E. casseliflavus* (100%; n=15) (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 7 - Número de *Enterococcus* sp. identificados nas amostras de graxaim-do-campo (*L. gymnocercus*).

Amostra	Número de espécies isoladas de cada espécie de enterococos provenientes de graxains-do-campo			
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>
CM2	-	8	2	1
CM3	-	3	7	-
CM4	-	2	4	-
CM5	-	2	4	1
CM7	-	9	-	-
CM12	15	-	-	-
TOTAL	15	24	17	2

5.1.2 *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais e orais de gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)

Destas sete amostras coletadas, cinco apresentaram resultados positivos para o gênero *Enterococcus*, obtendo-se um total de 56 isolados do gênero, destas 44 foram isolados de suabes retais (CM1, CM8, CM9 e CM10) e 12 isolados de suabe oral (CM11) (Tabela 8).

A espécie mais frequentemente identificada nos suabes retais de gatos-do-mato-grande foi *E. faecalis*, (81,2%; n=36), seguida por *E. faecium*, (27,3%; n=8). Da amostra oral CM11 foram isoladas apenas a espécie *E. faecium*, (100%; n=12) (Tabela 6 e Tabela 8).

Tabela 8 – Número de *Enterococcus* sp. identificados nas amostras de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*).

Amostra	Número de isolados de cada espécie de enterococos provenientes de gatos-do-mato-grande		
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>
CM1	12	-	-
CM8	11	-	-
CM9	12	-	-
CM10	1	-	8
CM11	-	12	-
TOTAL	36	12	8

5.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Os resultados do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, observados para 114 cepas isoladas das amostras de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande por local de coleta, podem ser verificados na Figura 9.

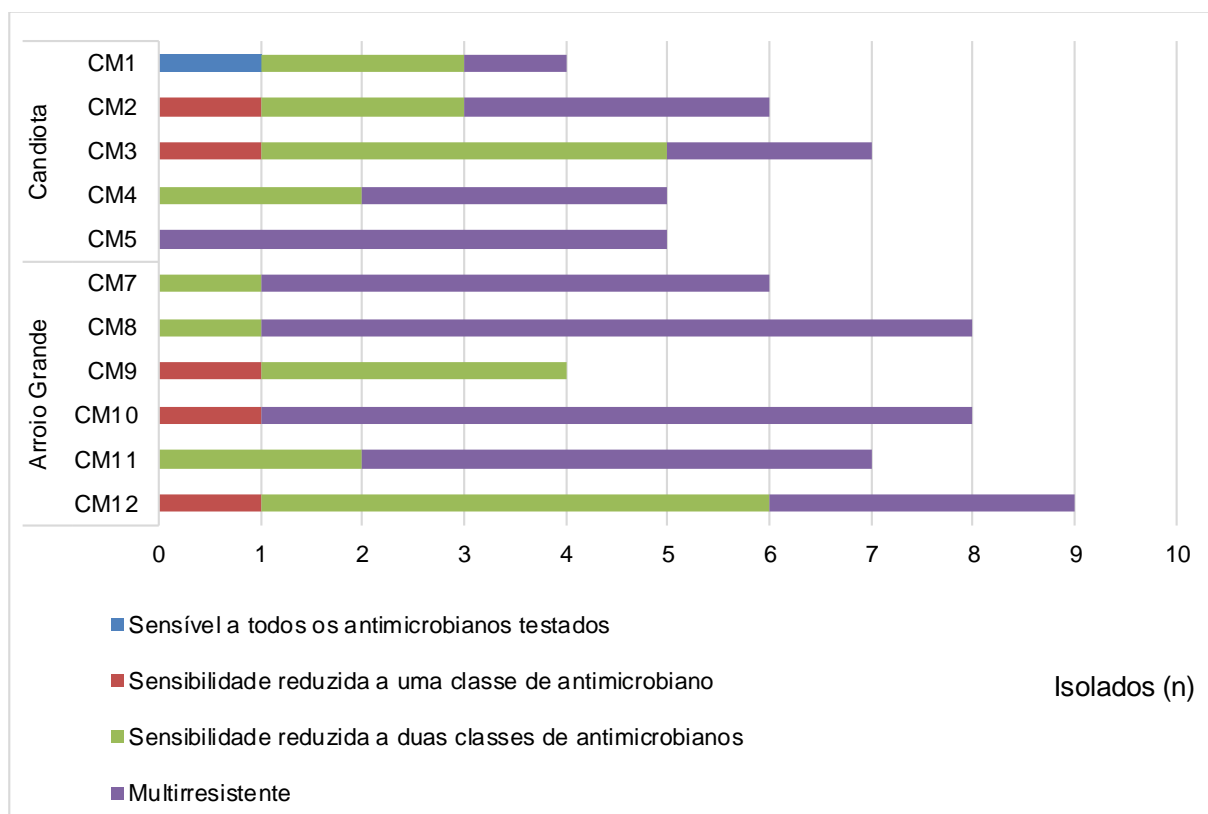


Figura 9 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana observada para as cepas isoladas das amostras de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande por local de coleta.

Na análise do perfil de susceptibilidade das 114 cepas, verificamos que algumas espécies de enterococos isoladas do mesmo animal apresentavam características fenotípicas de suscetibilidade ou suscetibilidade reduzida frente aos mesmos antimicrobianos, o que poderia indicar certa clonabilidade entre estas cepas. Sendo assim para não superestimar os dados referentes ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, as cepas com as mesmas características e provenientes dos mesmos animais foram agrupadas, gerando um total de 69 cepas, sendo estas 38 isoladas de amostras de graxains-do-campo e 31 de gatos-do-mato-grande.

Das 69 cepas, 68 (98,55%) apresentaram suscetibilidade reduzida a um ou mais antimicrobianos, sendo apenas o *E. faecalis* (1,44%) isolado da amostra CM1 sensível a todos os antimicrobianos testados. Das 68 cepas com suscetibilidade reduzida, cinco (7,35%) apresentaram suscetibilidade reduzida a uma classe (SR-1),

22 (32,35%) a duas classes (SR-2) e 41 (60,29%) a mais de duas classes, sendo considerados multirresistentes (MULTI-SR) (Tabela 9).

O perfil de suscetibilidade reduzida das cepas foi comparado ao local de coleta das amostras e observou-se que as cepas provenientes de Arroio Grande apresentavam elevadas taxas de SR-2 e MULTI-SR (95,85%) quando comparadas com Candiota (88,9%). Do total de 42 enterococos provenientes de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande coletados em Arroio Grande, 64,28% (n=27) apresentaram MULTI-SR. Em contrapartida, dos 27 isolados provenientes das espécies de animais amostrados em Candiota, 51,85% (n=14) apresentaram MULTI-SR (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de cepas (%) com sensibilidade e sensibilidade reduzida aos antimicrobianos isoladas de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande por local de coleta.

Localidade	S (%)	SR-1 (%)	SR-2 (%)	MULTI-SR (%)	Total (%)
Candiota	1 (3,70)	2 (7,41)	10 (37,04)	14 (51,85)	27 (100)
Arroio Grande	0	3 (7,14)	12 (28,57)	27 (64,28)	42 (100)
Total	1 (1,44)	4 (5,79)	22 (31,88)	41 (59,42)	69 (100)

S: Sensível; SR-1: Sensibilidade reduzida a uma classe de antimicrobiano testado; SR-2: Sensibilidade reduzida a duas classes antimicrobianos testadas; MULTI-SR: Sensibilidade reduzida a 3 ou mais classes de antimicrobianos testadas.

5.2.1 Perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais e orais de graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*)

Dos 38 isolados provenientes de graxaim-do-campo analisados, 7,89% (3/38) apresentaram suscetibilidade reduzida a uma única classe de antimicrobianos testados, 36,8% (14/38) para duas classes e 55,26% (21/38) apresentaram suscetibilidade reduzida a mais de três classes, sendo, portanto, classificados como multirresistentes.

A porcentagem de suscetibilidade antimicrobiana reduzida detectada nos isolados de *Enterococcus* sp. encontrados em graxains-do-campo pode ser visualizada na Tabela 10. Todos os isolados apresentaram suscetibilidade a ampicilina e vancomicina. As propriedades de suscetibilidade reduzida mais frequentemente encontradas foram para rifampicina (92,10%), eritromicina (71,05%), estreptomicina (39,41%), ciprofloxacina (31,6%), seguidas por tetraciclina (23,68%),

gentamicina (13,15%), nitrofurantoína (10,52%), linezolida (5,26%), norfloxacina e cloranfenicol (2,63%).

Em relação as espécies, verificou-se que todos os *E. durans*, *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram susceptibilidade reduzida a rifampicina. Do total de 16 *E. faecalis* isolados dos suabes retais (amostras CM2, CM3, CM4, CM5 e CM7), 81,25% (13/16) apresentaram susceptibilidade reduzida para eritromicina, 47,05% (8/16) para ciprofloxacina, 37,5% (6/16) para estreptomicina, 25% (4/16) para gentamicina, 18,75% (3/16) para nitrofurantoína e, 12,5% (2/16) para tetraciclina, 6,25% (1/16) para norfloxacina e 6,25% (1/16) para cloranfenicol. Todos os *E. faecalis* foram suscetíveis a linezolida.

Entre os 11 *E. faecium* isolados das amostras de suabes retais CM2, CM3, CM4 e CM5, as maiores frequências de suscetibilidades reduzidas observadas foram 63,6% (7/11) para a eritromicina, 36,3% (4/11) para ciprofloxacina e tetraciclina, 36,36% (4/11) para estreptomicina, seguidos de 9,1% (1/11) para nitrofurantoína e linezolida.

Entre os 9 *E. casseliflavus* isolados do suabe oral da amostra CM12, 66,66% (6/9) apresentaram susceptibilidade reduzida para rifampicina, 55,5% (5/9) para eritromicina, 33,33% (3/9) para estreptomicina, 22,2% (2/9) para tetraciclina e 11,1% (1/9) para ciprofloxacina e linezolida.

Antimicrobiano	Número de cepas de enterococos (%)				Total n (%)*
	<i>E. casseliflavus</i> (n=9)	<i>E. durans</i> (n=2)	<i>E. faecalis</i> (n=16)	<i>E. faecium</i> (n=11)	
Ciprofloxacina	1 (11,11)	0	7 (43,75)	4 (36,3)	12 (31,6)
Cloranfenicol	0	0	1 (6,25)	0	1 (2,63)
Eritromicina	5 (55,5)	2 (100)	13 (81,25)	7 (63,6)	27 (71,05)
Estreptomicina	4 (44,4)	1 (50)	6 (37,5)	4 (36,36)	15 (39,41)
Gentamicina	0	1 (50)	4 (25)	0	5 (13,15)
Linezolida	1 (11,1)	0	0	1 (9,1)	2 (5,26)
Nitrofurantoína	0	0	3 (18,75)	1 (9,1)	4 (10,52)
Norfloxacina	0	0	1 (6,25)	0	1 (2,63)
Rifampicina	6 (66,6)	2 (100)	16 (100)	11 (100)	35 (92,10)
Tetraciclina	2 (22,2)	1 (50)	2 (12,5)	4 (36,3)	9 (23,68)

Tabela 10 – Resultado do teste de suscetibilidade reduzida encontrada em isolados provenientes de graxains-do-campo.

*% calculado sobre as 38 cepas provenientes de graxains-do-campo.

Dos dois *E. durans* isolados de suabes das amostras CM2 e CM5, a cepa isolada da amostra CM2 apresentou susceptibilidade reduzida a eritromicina, gentamicina e rifampicina, enquanto o *E. durans* da amostra CM5 apresentou sensibilidade reduzida a eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e rifampicina.

Observou-se também que uma cepa de *E. faecalis* proveniente da amostra CM5 apresentou suscetibilidade reduzida a sete classes de antimicrobianos, sendo eles ciprofloxacina (Fluoroquinolona), cloranfenicol (Fenicol), eritromicina (Macrolídeo), estreptomicina (Aminoglicosídeo), nitrofurantoína (Nitrofurano), tetraciclina (Tetraciclina) e rifampicina (Rifampicina).

5.2.2 Perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais e orais de gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)

Dos 31 isolados, provenientes de gato-do-mato-grande, analisados, 6,45% (2/31) isolados apresentaram suscetibilidade reduzida a apenas uma classe de antimicrobianos testados, 25,80% (8/31) para duas classes e 64,51% (20/31) para 3 ou mais classes, sendo, portanto, classificados como multirresistentes.

Das 31 cepas de enterococos de gato-do-mato-grande testadas, apenas a cepa da espécie de *E. faecalis*, proveniente da amostra CM1, foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. As propriedades de suscetibilidade reduzida mais frequentemente encontradas foram para 67,64% (21/31) para eritromicina, 64,5% (20/31) para rifampicina, 48,38% (15/31) para tetraciclina, 41,9% (13/31) para ciprofloxacina, 29% (9/31) para estreptomicina, 25,8% (8/31) para nitrofurantoína, 6,45% (2/31) para gentamicina, 3,22% (1/31) para cloranfenicol. Todas as cepas de enterococos isolados de gatos-do-mato-grande apresentaram suscetibilidade a ampicilina, linezolida e vancomicina (Tabela 11).

Dentre as espécies estudadas, *E. faecalis* isoladas de suabes retais apresentou sensibilidade reduzida a uma maior variedade de antimicrobianos testados, sendo o mais alto índice para rifampicina com 88,2% (15/17), seguido por 70,6% (12/17) para eritromicina, 47,1% (8/17) para ciprofloxacina, 29,4% (5/17) para norfloxacina, 17,6% (3/17) para estreptomicina, 11,8% (2/17) para gentamicina, 5,9% (1/17) para cloranfenicol, nitrofurantoína e tetraciclina.

Entre os 7 *E. faecium* isolados da amostra de suabe oral CM11, as maiores frequências de suscetibilidades reduzidas observadas foram para a tetraciclina e eritromicina, 100% (7/7) e 85,71% (6/7), respectivamente. Para ciprofloxacina e norfloxacina, 71,42% (5/7) das cepas de *E. faecium* apresentaram susceptibilidade reduzida, seguidas por 28,57% (2/7) para nitrofurantoína. Todos os *E. faecium* isolados de gatos-do-mato-grande apresentaram susceptibilidade para ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, rifampicina e vancomicina.

Dos 7 *E. hirae* provenientes da amostra retal CM10 analisados, todos (100%) apresentaram susceptibilidade reduzida para tetraciclina, seguidos de 85,7 (6/7) para estreptomicina, 71,4% (5/7) para nitrofurantoína e rifampicina, 42,8% (3/7) para eritromicina e 14,3% (1/7) para norfloxacina. Todos os *E. hirae* isolados de gatos-do-mato-grande analisados foram suscetíveis a ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, linezolida e vancomicina.

Tabela 11 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida encontrada em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande.

Antimicrobiano	Número de isolados (%)			Total n (%)*
	<i>E. faecalis</i> (n=17)	<i>E. faecium</i> (n=7)	<i>E. hirae</i> (n=7)	
Ciprofloxacina	8 (47,1)	5 (71,42)	0	13 (41,9)
Cloranfenicol	1 (5,9)	0	0	1 (3,22)
Eritromicina	12 (70,6)	6 (85,71)	3 (42,8)	21 (67,74)
Estreptomicina	3 (17,6)	0	6 (85,7)	9 (29,0)
Gentamicina	2 (11,8)	0	0	2 (6,45)
Nitrofurantoína	1 (5,9)	2 (28,57)	5 (71,4)	8 (25,8)
Norfloxacina	5 (29,4)	5 (71,42)	1 (14,3)	11 (35,5)
Rifampicina	15 (88,2)	0	5 (71,4)	20 (64,5)
Tetraciclina	1 (5,9)	7 (100)	7 (100)	15 (48,38)

*% de cepas que apresentaram susceptibilidade reduzida dentre dos 31 isolados testados provenientes de gato-do-mato-grande.

5.3 Presença dos genes *tetL*, *tetM*, *msrC* e *ermB* relativos à redução de suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina

Todos os 48 *Enterococcus* sp. com suscetibilidade reduzida para eritromicina e os 24 com suscetibilidade reduzida a tetraciclina foram submetidos à PCR convencional afim de determinar a presença ou ausência dos genes relacionados a mecanismos de redução de suscetibilidade frente aos respectivos

antimicrobianos, sendo eles: *ermB* e *msrC* (para redução de sensibilidade à eritromicina) e *tetL*, *tetM* e *tetS* (para redução de sensibilidade à tetraciclina).

Foi possível observar que das cepas com sensibilidade reduzida a eritromicina, 15 enterococos (31,25%) apresentaram resultado positivo para a presença do gene *msrC* e 9 (18,75%) para o gene *ermB*. Ademais, 4 enterococos (8,33%) apresentaram resultado positivo para ambos os genes (Tabela 12). 28 enterococos (58,33%) com suscetibilidade reduzida para eritromicina não apresentaram amplificação para nenhum dos genes testados.

Dentre os 15 enterococos positivos para *msrC*, 9 (60%) eram da espécie *E. faecium*, 5 (33,3%) *E. faecalis* e 1 (6,6%) *E. durans*. Das 9 cepas positivas para o gene *ermB*, 4 (44,4%) eram de *E. faecium*, 3 (33,3%) eram de *E. hirae*, 1 (11,1%) era de *E. durans* e 1 (11,1%) era de *E. faecalis*.

Tabela 12 – Resultado da presença de genes que conferem redução na suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina em amostras de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande.

Gene	Animal	Nº de espécies positivas para o gene	Total de isolados positivos por animal amostrado (%)	Total de isolados positivos (%)
<i>ermB</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. durans</i>	1 (1,72)	9 (7,89)
		1 <i>E. faecalis</i>		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	4 <i>E. faecium</i>	8 (14,28)	
		3 <i>E. hirae</i>		
<i>msrC</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. durans</i>	9 (15,51)	15 (13,15)
		5 <i>E. faecalis</i>		
		3 <i>E. faecium</i>		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	6 <i>E. faecium</i>	6 (10,71)	
<i>tetL</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. durans</i>	1 (1,72)	16 (14,03)
		7 <i>E. hirae</i>		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	1 <i>E. faecalis</i>	15 (26,78)	
		7 <i>E. faecium</i>		
<i>tetM</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. durans</i>	1 (1,72)	16 (14,03)
		7 <i>E. hirae</i>		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	1 <i>E. faecalis</i>	15 (26,78)	
		7 <i>E. faecium</i>		

Quanto aos genes *tetL*, *tetM* e *tetS* relativos às 24 cepas que apresentaram redução de sensibilidade à tetraciclina, nenhuma apresentou resultado positivo para *tetS*. Entretanto, 16 (66,6%) apresentaram amplificação positiva para *tetL* e *tetM*,

simultaneamente (Tabela 12). Em adição, as maiores frequências dos genes *tetL* e *tetM* foram detectadas em cepas de enterococos provenientes de amostras de gato-do-mato-grande (93,75%).

As cepas de *E. casseliflavus* isoladas de graxaim-do-campo, apesar de apresentar sensibilidade reduzida a eritromicina (n=5) e a tetraciclina (n=2), não apresentaram resultado positivo para a amplificação dos genes de resistência testados.

Dos 27 enterococos com susceptibilidade reduzida a eritromicina provenientes de graxains-do-campo submetidos a análise, 9 amplificaram para o gene *msrC*, representando 33,3% dos isolados, e uma cepa de *E. durans* (3,7%) foi positiva para o gene *ermB* (Tabela 12). Nenhuma amostra amplificou mais de um gene relacionado a eritromicina simultaneamente. Do total de nove cepas que apresentaram susceptibilidade reduzida para tetraciclina, provenientes de graxaim-do-campo, apenas um *E. durans* (11,11%) apresentou resultado positivo para *tetL* e *tetM*, simultaneamente, enquanto que os oito isolados restantes apresentaram resultado negativo para ambos os genes, assim como para *tetS*.

Das 21 cepas provenientes de gatos-do-mato-grande que apresentaram susceptibilidade reduzida a eritromicina e foram submetidos a PCR convencional para a detecção dos genes de resistência *ermB* e *msrC*, dez (47,61%) amplificaram para o gene *msrC* e quatro (19,04%) apresentaram resultado positivo para os genes *ermB* e *msrC* simultaneamente. Das seis cepas positivas para o gene *msrC*, todas eram da espécie *E. faecium* e foram isoladas de uma amostra de suabe oral do gato-do-mato-grande. Quanto ao gene *ermB*, das oito cepas positivas, três (37,5%) eram *E. hirae*, quatro (50%) eram *E. faecium* e uma (12,5%) era *E. faecalis*. Todas as 15 cepas classificadas com susceptibilidade reduzida a tetraciclina originados de gatos-do-mato-grande, apresentaram amplificação positiva para os genes *tetL* e *tetM*, simultaneamente. Destas, sete (46,6%) são *E. hirae*, uma (6,6%) *E. faecalis* e sete (46,6%) *E. faecium* (Tabela 12).

5.4 Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados

A presença dos fatores de virulência foi testada para todas as 114 cepas isoladas no presente estudo foram submetidos a PCR convencional para os genes de virulência *ace*, *agg*, *cylA*, *esp* e *geE*. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Das 114 cepas, 60,52% (69/114) apresentaram pelo menos um dos genes testados, sendo as maiores frequências observada para os genes *ace* (59,65%) e *geE* (51,75%), e as menores para *agg* (21,93%), *esp* (0,88%) e *cylA* (0,88%).

Referente à distribuição dos genes entre as espécies, das 68 (59,64%) positivas para *ace*, 50 (60%) eram *E. faecalis* e 18 (33,96%) eram *E. faecium*. Quanto ao gene *geE*, das 59 (51,75%) cepas positivas, 50 (84,74%) eram da espécie *E. faecalis* e nove (15,25%) *E. faecium*. Das 25 (21,92%) cepas que apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene *agg*, todas eram *E. faecalis*. Os genes *cylA* e *esp* foram positivos apenas nas cepas de *E. hirae* isoladas de graxains-do-campo e *E. faecium* isolada de gato-do-mato-grande, respectivamente.

Tabela 13 – Resultado da análise para verificação de presença de genes de virulência e expressão enzimática em amostras de gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo.

	Animal	Nº de espécies positivas para o gene (%)	Total de isolados positivos por animal amostrado (%)	Total de isolados positivos (%)
Gene				
<i>ace</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	15 <i>E. faecalis</i> (62,5)	25 (43,10)	68 (59,64)
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	10 <i>E. faecium</i> (58,82)		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	35 <i>E. faecalis</i> (97,22) 8 <i>E. faecium</i> (66,6)	43 (76,78)	
<i>agg</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	9 <i>E. faecalis</i> (37,5)	9 (15,5)	25 (21,92)
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	16 <i>E. faecalis</i> (44,4)	16 (28,57)	
<i>cylA</i>	<i>Leopardus geoffroyi</i>	1 <i>E. hirae</i> (12,5)	1 (1,78)	1 (0,87)
<i>esp</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. faecium</i> (5,88)	1 (1,72)	1 (0,87)
<i>geE</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	15 <i>E. faecalis</i> (62,5)	24 (41,37)	59 (51,75)
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	9 <i>E. faecium</i> (52,94)		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	35 <i>E. faecalis</i> (97,22)	35 (62,5)	
Fenótipo				
Gelatinase	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	11 <i>E. faecalis</i> (45,83)	12 (20,68)	30 (26,31)
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	1 <i>E. faecium</i> (5,88)		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	18 <i>E. faecalis</i> (50)	18 (32,14)	
Hemólise	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 <i>E. faecalis</i> (4,16)	15 (25,86)	16 (14,03)
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	14 <i>E. casseliflavus</i> (93,3)		
	<i>Leopardus geoffroyi</i>	1 <i>E. faecium</i> (8,33)	1 (1,78)	

Tanto em gatos-do-mato-grande quanto em graxains-do-campo, a maior frequência de enterococos que apresentaram este gene são da espécie *E. faecalis*, visto que, em amostras de felinos, *E. faecalis* foi a única espécie com isolados positivos e, em amostras de caninos, do total de 24 isolados positivos, *E. faecalis* representam 62,5% contra 37,5% de *E. faecium*.

Os perfis de virulência em isolados provenientes de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande foram comparados e, a partir desta análise, foi possível observar que, proporcionalmente, gatos-do-mato-grande apresentaram maior índice das cepas positivas para genes de virulência (78,57%) do que as cepas isoladas de graxains-do-campo (27,58%) (Figura 10).

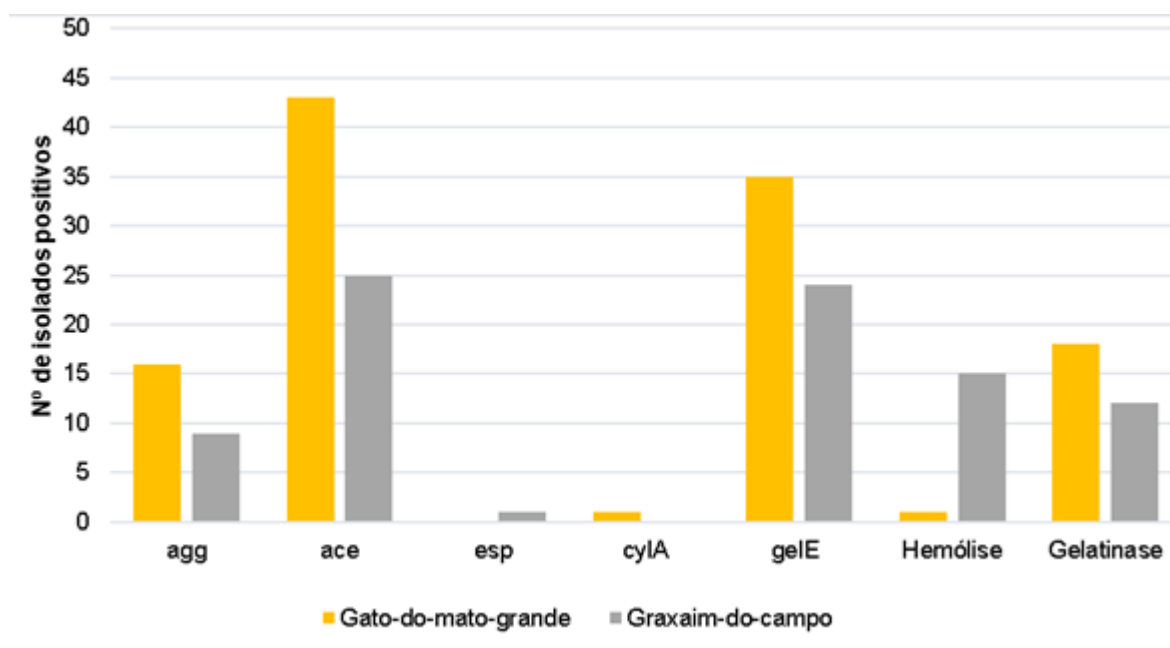


Figura 10 – Representação gráfica comparativa dos perfis de virulência em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande e de graxains-do-campo.

Nas cepas isoladas dos gatos-do-mato-grande, os genes *ace* (n=43; 76,78%), *gelE* (n=35; 62,5%) e *agg* (n=16; 28,57%) foram observados com elevada frequência. Por outro lado, não foram encontradas cepas com resultado positivo para *esp* e apenas uma cepa (1,78%) apresentou resultado positivo para amplificação de *cylA*, sendo este da espécie *E. hirae*.

Nas cepas provenientes de amostras de graxains-do-campo não foi detectado o gene *cylA*. Apenas um isolado de *E. faecium* apresentou amplificação para o gene *esp*, representando 1,72% total de cepas isoladas de origem canina

(n=58). Os genes mais frequentemente encontrados com resultados positivos foram *ace* (n=25; 43,10%) e *geE* (n=24; 41,37%).

5.5 Avaliação da atividade das enzimas gelatinase e citolisina, codificadas pelos genes *geE* e *cyA*, respectivamente

O teste fenotípico de atividade hemolítica foi realizado em todos os 114 isolados deste estudo, independentemente de apresentar resultados positivos para amplificação do gene *cyA*, que codifica a enzima citolisina. Deste total, apenas 16 (14,03%) isolados foram capazes de realizar a hemólise total ou parcial do sangue de carneiro (Tabela 13). Nenhuma das cepas positivas apresentaram o gene *cyA*. As espécies *E. durans*, *E. hirae* e *E. faecium* não apresentaram atividade hemolítica.

Os 59 isolados positivos para a presença do gene *geE* foram submetidos ao teste para a detecção da expressão da enzima gelatinase. Destes, 30 foram capazes degradar a gelatina presente no meio de cultura, representando 26,31% dos isolados obtidos no estudo. Ambos os resultados podem ser observados na Tabela 13.

Das 58 cepas isoladas de graxaim-do-campo testadas para a atividade de hemólise em ágar sangue, 15 (25,86%) apresentaram halos de atividade hemolítica em ágar sangue, 14 destes identificados como *E. casseliflavus*, uma *E. faecium* e uma *E. faecalis* (Tabela 13). Apenas uma cepa originada de gato-do-mato-grande apresentou atividade hemolítica, sendo esta identificada como *E. faecalis*. Nenhuma das amostras que apresentaram atividade hemolítica amplificaram o gene de resistência *cyA*.

Quanto ao teste fenotípico para produção de gelatinase, das 24 cepas de enterococos positivas para o gene *geE* isoladas de graxaim-do-campo, 12 (50%) foram capazes de degradar a gelatina sendo destas 11 *E. faecalis* e 1 *E. faecium*. Em relação as 35 cepas de *E. faecalis* positivas para o gene *geE* isoladas de gato-do-mato-grande, 18 (51,42%) foram capazes de degradar a gelatina (Tabela 13).

6 DISCUSSÃO

6.1 Distribuição de *Enterococcus* sp. isolados de amostras de Canídeos e Felídeos

A escassez de estudos que avaliam a microbiota de canídeos e felídeos selvagens, mais especificamente sobre enterococos pertencentes a microbiota gastrointestinal e oral, impossibilitou uma comparação direta dos resultados obtidos neste estudo. Entretanto, com a finalidade de compreender as possíveis vias de disseminação destes microrganismos, foram avaliados fatores ambientais e interações ecológicas extraentéricos onde enterococos podem ser encontrados.

Neste estudo foi possível detectar a presença do gênero *Enterococcus* em amostras de suabes retais e orais de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande selvagens capturados em duas localidades do Bioma Pampa. Devido a sua natureza ubíqua, *Enterococcus* sp. são microrganismos naturalmente encontrados em plantas, insetos, solo e como parte da microbiota gastrointestinal de humanos e animais (Lebreton et al., 2014). A presença deste gênero nas amostras de fezes de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande corroboram com outros estudos que também isolaram enterococos em amostras de fezes de mamíferos selvagens (Lebreton et al., 2014; Santestevan, 2014, Prichula, 2015; Montealegre et al., 2016; Grassotti, 2018;).

Apesar de haver crescimento microbiano nas amostras CM6 e CM13, não foi possível obter isolados de *Enterococcus* spp. nestas amostras. Uma possível explicação é que outros grupos de bactérias são mais prevalentes no trato gastrointestinal destes animais. Santestevan (2014) também não isolou enterococos em fezes de duas amostras de lobos-marinhos selvagens.

Enterococcus faecalis, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* foram detectadas em 68,96%, 33,3%, 9,19% e 2,29%, respectivamente nas amostras de suabes retais de gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo selvagens. Devriese e colaboradores (1987) descreveram as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* como sendo as mais comumente encontradas no intestino de diversas espécies de mamíferos em biomas variados, enquanto que outras espécies de enterococos pareciam ser ocasionais. Estudos avaliando a diversidade de enterococos em amostras de fezes de mamíferos não pertencentes às famílias Felidae e Canidae tem apresentado composição semelhante destas espécies bacterianas em diversas

espécies de animais, incluindo selvagens (Devriese et al., 1987; Lebreton et al., 2014; Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Grassotti, 2018).

Relacionando a presença e variedade de *Enterococcus* sp. em amostras de suabe retal de gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo, observamos que *E. faecalis* foi a única espécie isolada em todas as amostras retais de felídeos e canídeos. Resultados semelhantes foram observados por Devriese e colaboradores (1992) em amostras fecais e de tonsilas de cães e gatos domésticos. A maior frequência de *E. faecalis* nestas amostras corrobora também com outros estudos que apontaram frequências elevadas desta espécie em amostras do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (Lebreton et al., 2014), de diversas espécies de animais selvagens (Poeta et al., 2005; Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Grassotti, 2018) e de animais domésticos e de criação (Devriese et al., 1987; Devriese et al., 1992).

A dieta de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande é principalmente composta por pequenos roedores de vida livre. O número de estudos acerca da microbiota roedores selvagens é muito limitado, geralmente direcionados aos relatos de caso de bactérias de interesse sanitário como campilobacter (Ferne et al., 1976), salmonelas (Junior & Lane, 1989) e bacilos (Swiecicka et al., 2003). Contudo, Lauková e colaboradores (2008), em um estudo direcionado para a pesquisa com *Enterococcus* spp., obteve 24 isolados de amostras intestinais de roedores selvagens, 17 destas identificadas como *E. faecalis*, sendo esta a espécie mais abundante no seu estudo. No seu conjunto, estes dados sugerem que a microbiota intestinal de gatos-do-matogrande e de graxains-do-campo estão altamente relacionados com seus hábitos alimentares, visto que *E. faecalis* foi a espécie mais com maior incidência, encontrada tanto nos predadores quanto em sua presa mais frequente.

No presente estudo, *E. hirae* foi observado em 7,02% das amostras de suabes retais nos animais testados. A presença desta espécie de enterococos em amostras fecais de animais selvagens também foi relatada por Poeta e colaboradores (2005) onde *E. hirae* apresentou uma frequência de 10% em amostras fecais originadas de aves, mamíferos e outros animais selvagens.

A presença de *E. hirae* e *E. durans* em amostras retais de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande foi associada à dieta que inclui aves silvestres e, por vezes, o consumo de frangos de criação em fazendas. Estudos como de Poeta e colaboradores (2005) e Santos e colaboradores (2013), relatam a presença de ambas

as espécies de enterococos em aves. A baixa frequência das cepas encontradas neste estudo pode estar relacionada a frequência igualmente baixa, porém constantemente relatada, de aves na dieta de canídeos e felídeos. De acordo com os estudos de Manfredi e colaboradores (2004), Capuneccia e colaboradores (2006) e Canel e colaboradores (2016), os canídeos e felídeos do Pampa Argentino apresentam certo grau de adaptabilidade no forrageamento devido a disponibilidade de presas no espaço geográfico em que estão inseridos, levando os animais predadores a estabelecerem uma fonte secundária de alimento.

Enterococcus casseliflavus foi a única espécie observada na amostra de suabe oral de graxaim-do-campo selvagem e *E. faecium* nas amostras orais de gatos-do-mato-grande selvagens. A microbiota oral de mamíferos carnívoros selvagens é pouco conhecida devido à escassez de estudos, impossibilitando a comparação direta dos resultados obtidos neste trabalho, entretanto, Abdel-Moein e colaboradores (2017) relatam a presença de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras orais de cães e gatos domésticos. No estudo, os autores identificaram a prevalência de *E. faecalis* em gatos com frequência em gatos 5,3%, corroborando com os resultados do atual estudo. *E. casseliflavus* são frequentemente relatados em amostras de artrópodes (Huff, 2018; Lebreton et al., 2014) e em frutas (Abriouel et al., 2008), que são consumidos mais frequentemente por graxains-do-campo adultos em período de prole, quando priorizam o consumo de itens menos nutritivos e levam os de maior valor nutricional (roedores, aves, carcaças e lebres) para os filhotes (Castillo et al., 2011).

Jimenez e colaboradores (2013) desenvolveram um estudo para avaliar a presença de *Enterococcus* sp. em leite de diferentes espécies animais, onde foi possível detectar as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* e *E. durans*, comprovando que o leite materno é uma via de transmissão de cepas de enterococos ao trato gastrointestinal de animais juvenis. Ainda, os autores obtiveram alta incidência de *E. faecium* em amostras de leite provindas de canídeos ($2,62 \times 10^3$ UFC/mL na amostra C3 e $1,24 \times 10^2$ UFC/mL na amostra C4). Com resultados semelhantes, em amostras de graxains-do-campo classificados como juvenil (CM3) e filhote (CM5) do atual estudo, foi encontrado maior prevalência de *E. faecium*, com as frequências de 70% e 57,14%, respectivamente. Inferimos, portanto, que o leite

materno de graxains-do-campo possa ser o transmissor de *E. faecalis* para o TGI dos filhotes.

Moeller e colaboradores (2017) afirmam que o processo que gera e mantém a diversidade bacteriana intestinal de mamíferos ainda é pouco compreendida, entretanto, seu estudo aponta que a proximidade entre espécies hospedeiras, assim como entre predadores e presas, gera a homogeneização da microbiota em comunidades de mamíferos.

6.2 Resistência e Virulência em cepas provenientes de canídeos e felídeos

Dentre os antimicrobianos testados frente às amostras de enterococos isolados de amostras retais e orais de graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande, rifampicina (76,81%), eritromicina (69,56%), ciprofloxacina (36,23%), tetraciclina (34,78%) e estreptomicina (34,78%) apresentaram os maiores índices de suscetibilidade reduzida. Quando comparados os resultados obtidos no presente estudo com outros que também avaliaram o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterococos isolados de outras espécies de animais selvagens, as frequências observadas aqui foram muito elevadas.

Grassotti (2018), isolou cepas de *Enterococcus* spp. com suscetibilidade reduzida para à rifampicina (46,3%), tetraciclina (26,0%) e eritromicina (22,3%) em amostras de fezes ou suabes retais macacos-prego selvagens coletados em intermédios florestais próximos a um hospital, um fragmento florestal e um zoológico. Seus resultados sugerem que o perfil de resistência encontrado nas amostras se deve, dentre outros fatores, à ação antropogênica observada no habitat e o resistoma ambiental. Poeta e colaboradores (2005) isolaram diferentes espécies de enterococos de amostras de fezes de animais selvagens em Portugal e observaram níveis relativamente baixos (31,4%) de suscetibilidade reduzida nas cepas isoladas dos animais selvagens.

Suscetibilidade reduzida para rifampicina tem sido considerada comum em cepas de enterococos. A resistência à rifampicina relativa ao gênero ocorre principalmente devido a mutações pontuais no gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA polimerase. Em uma revisão feita por Miller e colaboradores (2014) foi descrita a existência de um isolado de *E. faecium* resistente à rifampicina, que não

apresentava evidência de mutações no gene *rpoB*, bombas de efluxo ou enzimas de inativação. Esta frequência elevada de suscetibilidade reduzida à rifampicina entre enterococos identificadas no presente estudo pode sugerir uma consequência de cepas comensais estarem sendo expostas ao antimicrobiano, mas outros fatores ainda desconhecidos também podem contribuir para a ocorrência de isolados enterocócicos resistentes (Gillings & Strokes, 2012; Garrido et al., 2014). Por se tratarem de cepas obtidas de amostras de animais selvagens, infere-se que o estreito contato entre estes animais e o ambiente antropizado possa ser um dos fatores-chaves para a dispersão de microrganismos que apresentam mecanismos de redução de sensibilidade antimicrobiana para as cepas selvagens.

Cepas com este perfil também já foram observadas em amostras de esgoto doméstico (Costa et al., 2006), morcegos (Costa, 2018) e lepidópteros (Huff, 2018). Costa (2018) analisou a presença de cepas suscetíveis a rifampicina em amostras de *Enterococcus* sp. isolados de fezes de morcegos selvagens no sul do Brasil. Em seu estudo foi observado que as cepas apresentaram elevados índices de suscetibilidade reduzida a rifampicina (72,6%), seguido por eritromicina (43,83%). A proximidade dos graxains-do-campo e gatos-do-mato-grande selvagens a locais urbanizados, assim como observado com os morcegos, poderiam sugerir essa elevada frequência de cepas não suscetíveis. Tanto em Arroio Grande quanto em Candiota, foram observadas a presença e circulação de graxains-do-campo e de gatos-do-mato-grande nas proximidades de casas, interagindo com humanos e animais domésticos, além de serem encontrados no interior de fábricas, na beira das estradas e muitas vezes os animais caçam dentro de propriedades rurais, alimentando-se inclusive de aves e lebres de criação. O esgoto de algumas residências, assim como o lixo gerado por atividade humana, são fatores que influenciam na dispersão de microrganismos patogênicos. Tais dejetos foram encontrados sendo depositados em arroios e lagos muito próximos aos locais de captura dos animais selvagens trabalhados.

A presença de cepas com elevadas frequências de redução da suscetibilidade a eritromicina tem particular interesse, uma vez que macrolídeos tem sido utilizados como tratamento alternativo de infecções enterocócicas principalmente quando há casos de alergia a penicilina (Portillo et al., 2000). Cepas com resistência a este antimicrobiano já foram isoladas de outras amostras de animais selvagens no

Rio Grande do Sul, como macaco prego (Grassotti, 2018), tartarugas marinhas, pinguins e lobos marinhos (Prichula, 2015; Santestevan, 2014; Pereira, 2016).

Os genes *ermB* e *msrC* associados a resistência a eritromicina foram testados em 21 isolados que apresentaram sensibilidade reduzida ao fármaco. O gene *msrC* (71,42%) apresentou maior frequência quando comparado a *ermB* (42,85%). Apesar do gene *ermB* ser comumente encontrado entre enterococos isolados de humanos e animais, no presente estudo este foi observado em menor frequência, quando comparado com o gene *msrC*. O gene *msrC* possui 53 a 62% de identidade com o gene *msrA* de estafilococos e codifica um transportador ABC para macrolídeos e estreptogramina B (Werner et al., 2006) A presença do gene *msrC* tem sido observada com elevada frequência em cepas de enterococos isoladas de animais selvagens no Rio Grande do Sul (Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Pereira, 2016; Grassoti, 2018). Em 2001, Singh e colaboradores demonstraram o sequenciamento completo do gene *msrC*, até então tido como espécie específico de *E. faecium*. Entretanto, no presente trabalho, assim como em estudos recentes (Molale & Bezuidenhout, 2016; Grassoti, 2018), outras espécies também são registradas como portadoras do gene, comprovando o fluxo gênico no gênero.

Resistências à fluoroquinolona ciprofloxacina foi o terceiro maior índice de suscetibilidade reduzida (36,23%) em todas as amostras testadas, corroborando com estudos anteriores que apontam um aumento desta incidência em animais de companhia (Rodrigues et al., 2002). O uso de fluoroquinolonas no tratamento pets é realizado a décadas, principalmente para o tratamento de doenças urinárias em felinos (Cohn et al., 2003). A suscetibilidade reduzida em diversas espécies bacterianas está se tornando cada vez mais comum e é mediada pela combinação de resistências plasmideais a fluoroquinolonas (PQMR) em conjunto com mutações cromossomais que afetam a proteína topoisomerasas e o efluxo celular (Weese, 2008; Gibson, 2010). A proximidade dos gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo com os animais domésticos, pode estar associada a este perfil.

Os genes mais encontrados entre os isolados de gatos-do-mato-grande e graxains-do-campo analisadas foram *tetM*, em conjunto com o gene *tetL*, ambos presentes em 66,6% das cepas com suscetibilidade reduzida a tetraciclina (16/24). Prichula, (2016) também encontraram o gene *tetM* em maior frequência em seus isolados de animais marinhos selvagens (73,07%). Os resultados também se

assemelham com os achados de Poeta e colaboradores (2005), no qual foram obtidos os maiores índices para *tetL* e *tetM* em *Enterococcus* spp. isolados de animais selvagens em Portugal. Nele, todas as cepas que apresentaram suscetibilidade reduzida a tetraciclina apresentaram resultado positivo para os genes. A alta frequência em o que gene *tet* é reportado se deve ao fato de estar associado a plasmídeos em elementos móveis ou conjugativos, tornando-o facilmente transferível entre os microrganismos (Clewell et al., 1995; Chopra & Roberts, 2001).

A presença de elementos gênicos que conferem redução da suscetibilidade aos antimicrobianos em bactéria patogênicas é um dos problemas mais significativos no tratamento de doenças atualmente, provavelmente devido a transferência horizontal, no qual o microrganismo adquire redução da suscetibilidade por genes do ambiente (Thomas & Nielsen, 2005). Estudos indicam que estes elementos móveis são compartilhados entre bactérias patogênicas e comensais no microbioma do trato gastrointestinal de seres humanos (Witte, 1998; Salyers et al., 2004; Aarestrup, 2005).

Alguns genes que conferem redução a sensibilidade a antimicrobianos, em verdade, possuem outros papéis primários de ação na célula bacteriana. A exemplo, as bombas de efluxo que podem atuar como um mecanismo de redução da sensibilidade da célula bacteriana a antimicrobianos, mas possuem função primária como mecanismos de proteção celular contra moléculas tóxicas, como metais pesados, expulsando-os para o meio externo da célula. Comprovando que este mecanismo não está diretamente associado à presença de antimicrobianos, estudos indicam que comunidades microbianas, pertencentes ao trato gastrointestinal de insetos que não obtiveram contato com os fármacos, possuem bombas de efluxo que conferem redução na suscetibilidade a antimicrobianos em ensaios, onde os genes promotores do mecanismo foram transferidos para modelos in vitro utilizando *Escherichia coli* (Kadavy et al., 2000; Allen et al., 2009). Acredita-se que este mecanismo seja uma proteção da célula bacteriana contra toxinas naturalmente liberadas pelas plantas ingeridas pelos insetos.

Foi observado pela equipe que realizou a coleta de amostras de *L. gymnocercus* e *L. geoffroyi* que os animais ocupavam áreas altamente antropizados. Grandes fábricas cimenteiras e usinas termelétricas estão situadas no município de Candiota. A cidade também é conhecida pela grande quantidade de fazendas, algumas delas situadas próximas aos pontos de coleta. Dados de telemetria estão

sendo realizados atualmente pela equipe de coleta. Em resultados preliminares, observou-se que um dos animais amostrados neste estudo, CM1 (*L. geoffroyi*), habitualmente transita dentro da propriedade da fábrica cimenteira, nos arredores e no quintal das casas, assim como dentro de propriedades com atividade agrícola. Os animais capturados em Arroio Grande também sofrem com alta antropização, sendo observada a grande quantidade de lavouras de arroz ao redor dos pontos de coleta, assim como pela baixa integridade do bioma nativo original observada no local.

Apesar da falta de mais dados referentes ao animal em que foi obtido o resultado parcial de telemetria e dos demais animais amostrados, ficou evidente para a equipe de coleta que o ambiente destes animais está sujeito a grandes impactos antropogênicos e, com base nos estudos a cerca de resistoma ambiental e nos dados apresentados ao longo deste trabalho a respeito do contato de humanos e animais selvagens, é possível inferir que a alta resistência apresentada neste estudo pode ter conexão com: 1) o resistoma ambiental, principalmente correlacionado à bomba de efluxo, visto que os antimicrobianos que apresentaram maiores índices de redução na sua efetividade atuam no meio intracelular; 2) o contato direto entre humanos, animais domésticos e de fazendas que: favorece a contaminação por possíveis microrganismos transmissores de mecanismos que provocam redução na suscetibilidade a antimicrobianos; contamina o ambiente com metais pesados (que podem ser encontrados em resíduos de fábricas), resíduos referentes a atividade pecuarista e agrícola, assim como resíduos referentes as habitações.

Na pecuária, o antimicrobiano é utilizado, não apenas para o tratamento de doenças infecciosas, mas também como promotor de crescimento em animais de corte saudáveis e alguns destes antimicrobianos, como amoxicilina e eritromicina, são utilizados para ambas as finalidades (Sarmah et al., 2006). Portanto, o uso de antimicrobianos utilizados em larga escala, independente da finalidade, geram uma pressão seletiva no ambiente, atuando como um catalisador no desenvolvimento e disseminação de genes que conferem aos microrganismos redução na eficiência aos compostos (Allen, 2010).

Segundo Gustafson & Bowen (1997) o uso de antimicrobianos em agricultura animal, apesar de trazer grandes benefícios para as criações, geram resíduos de fármacos no esgoto e no ambiente, atuando por pressão seletiva em microrganismos que fazem parte da microbiota dos animais ali tratados ou presentes

no solo, nas plantas e na vida selvagem. Bager e colaboradores (1997) conduziram um estudo para determinar a associação entre o uso de antimicrobiano da classe de glicopeptídeos, usados como promotores de crescimento em animais de criação, e o aumento da ocorrência de *E. faecium* resistentes à vancomicina em aviários e criações de porcos. O estudo forneceu evidências de que existe uma relação causal entre a resistência e o uso do antimicrobianos e, ainda, que os animais atuam como potenciais reservatórios de patógenos que afetam a saúde de humanos.

Em um estudo realizado na Noruega, Mo e colaboradores (2018) estimaram e compararam a ocorrência de suscetibilidade reduzida em *Escherichia coli* isoladas de 528 raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) em relação a densidades populacionais humanas. Os autores separaram as amostras por densidade municipal onde as raposas foram coletadas, configurando 108 amostras de raposas em baixa, 328 em média e 92 em alta densidades populacionais. Os isolados foram submetidos a teste de suscetibilidade antimicrobiana frente cefalosporinas e fluoroquinolonas de espectro estendido, cultura seletiva para carbapenens e colistinas e enterococos resistentes à vancomicina. Seus resultados indicaram que havia associação entre os índices de resistência em raposas e a densidade populacional do município onde a raposa foi capturada e que, por apresentar área de vida limitada, as raposas poderiam ser utilizadas como boas sentinelas para o monitoramento de resistência antimicrobiana no ambiente. Este resultado pode ser associado ao observado no presente estudo, visto que a raposa vermelha apresenta proximidade evolutiva com graxains-do-campo e, em menor grau, ao gato-do-mato-grande; suas áreas de vida também são limitadas, apesar de apresentar certo grau de flexibilidade e ambos os estudos apresentaram altas incidências de suscetibilidade reduzida em grupos de animais selvagens próximos a áreas com maior presença de ação antrópica.

A capacidade do enterococos de persistir em ambientes adversos, com altos níveis de sal e temperaturas elevadas, demonstrando a capacidade de habitar os mais diversos ambientes. De fato, o gênero é citado nos mais diversos estudos, desde a superfície de vegetais, solo, trato gastrointestinal de diversas espécies de mamíferos, reptéis e insetos, adaptando-se aos mais diversos nichos. (Shepard & Gilmore, 2002). Devido ao aumento de casos de enterococos resistentes aos antimicrobianos, mais esforços tem sido feitos para determinar os fatores envolvidos no relacionamento comensal entre microrganismo e o hospedeiro a fim de tratar as

cepas que apresentam maior persistência infecciosa com terapêuticas alternativas (Shepard & Gilmore, 2002). A patogenicidade deste gênero é multifatorial e complexa. Um dos fatores envolvidos é a capacidade dos microrganismos de colonizar e causarem algum tipo de dano ao hospedeiro, sendo estes conhecidos como fatores de virulência (Mundy et al., 2000).

A citolisina é uma proteína decodificada pelo gene *cyIA* que possui capacidade hemolítica e bactericida. Neste estudo foi encontrada apenas uma cepa que apresentou amplificação positiva para o gene *cyIA*, provinda da amostra CM10 de gato-do-mato-grande, identificada como *E. hirae*. Entretanto, este isolado não apresentou atividade hemolítica em cultivo enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro. Por outro lado, dois isolados de *E. faecalis* (um de suabe retal de gato-do-mato-grande e um de suabe retal de graxaim-do-campo) e 14 *E. casseliflavus* provenientes de amostra oral de graxaim-do-campo, apresentaram β -hemólise apesar de não apresentarem amplificação positiva para o gene *cyIA*. Este fato se deve à capacidade dos *Enterococcus* sp. de produzirem outro componente citotóxico, a alta produção de peróxido de hidrogênio. Moy e colaboradores (2004), em um estudo utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* como modelo, afirma que este composto causa danos celulares similares aos causados pela citolisina, sendo esta também uma explicação viável para a ocorrência neste trabalho.

A presença dos genes *ace* (59,65%; n=68) e *gelE* (51,75%; n=59) foram os mais frequentes em todas as amostras obtidas, seguido por *agg* (21,93%; n=25), *esp* e *cyIA* (ambos com 0,85%; n=1). A presença destes genes de virulência em amostras de animais selvagens é consistente com trabalhos anteriores. Eaton & Gasson (2001) também obtiveram resultado semelhante em seu trabalho com enterococos originados de amostras de alimentos.

Enterococcus faecalis foi à espécie que mais apresentou fatores de virulência, sendo que, das 51 cepas isoladas 46 (90,19%) apresentaram ao menos um gene de virulência testados. Além disso, também foi o mais prevalente na incidência de atividade enzimática de gelatinase, ocupando 96,6% (29/30) das 30 amostras positivas para a degradação da gelatina em meio de cultura. Estes resultados confirmam os registros na literatura que indicam o *E. faecalis* como sendo naturalmente mais ubíquo dentro todas as espécies conhecidas do gênero até o presente momento (Gao et al., 2018).

A expressão fenotípica da gelatinase e da β -hemólise, assim como a incidência dos genes *esp*, *gelE* e *cylA*, em *Enterococcus* spp. são associados a isolados de origem clínica (Eaton & Gasson, 2001; Billström et al., 2008; Fisher e Phillips, 2009). Portanto, pode-se dizer que os animais amostrados neste estudo possuem pouco ou nenhum contato com contaminantes clínicos em seu habitat. A baixa incidência do gene *esp* nos isolados obtidos neste estudo pode indicar que os animais não possuem contato direto com poluição fecal humana, visto que Scott e colaboradores (2005) associaram a presença deste gene ao contaminante.

Ainda, o estreito contato envolvendo a tríade humanos, animais selvagens e animais domésticos é uma via de transmissão de doenças através de ectoparasitas, oferecendo risco para a saúde de humanos, mas também dos animais selvagens e domésticos. Em estudos recentes Souza e colaboradores (2019) relataram que em sua pesquisa para investigação de rangeliase canina (doença transmitida por carrapatos e causada pelo protozoário *Rangelia vitalii*), duas espécies de canídeos do pampa brasileiro, *Cerdocyon thous* e *L. gymnocercus*, eram portadores da doença e apresentavam quadro clínico saudável. A hipótese dos autores é de que os canídeos neotropicais são portadores naturais de *R. vitalii* e que os animais domésticos são hospedeiros acidentais do parasita. Schott e colaboradores (2019) investigaram a presença de *Rickettsia* spp e *Bartonella* spp. em pulgas de *C. thous*. Dos 29 animais amostrados, quatro carregavam pulgas potencialmente portadoras dos microrganismos, ambos considerados patógenos negligenciados de importância humana e veterinária.

A ocupação humana em áreas de vida selvagem também geram impacto direto nas populações de roedores e aves disponíveis para caça, reduz a densidade de biomassa de espécies vegetais e altera a produtividade no habitat. Muitas vezes, este quadro impele os animais selvagens a procurarem novas fontes de alimento, principalmente nos meses de inverno que exigem maior quantidade de energia disponível para a sobrevivência dos animais (Cruz et al., 2018). A atividade de animais selvagens em fazendas aumenta de acordo com a disponibilidade de presa em seu ambiente e de área de vida, levando-os a procurar alimento muito próximo às áreas de ocupação humana e a caçar animais de criação como frangos, coelhos e ovelhas.

7 CONCLUSÃO

Foram identificadas *Enterococcus* spp. nas amostras de suabes retais e orais de graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e de gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) selvagens de duas regiões do estado do Rio Grande do Sul.

As cepas de enterococos apresentaram sensibilidades reduzidas aos antimicrobianos de uso clínico e veterinário. Das espécies que apresentaram maiores ocorrências de suscetibilidade reduzida, *E. faecalis* apresentou o maior índice.

O perfil de sensibilidade reduzida múltipla entre os enterococos foi encontrado em ambas as espécies de animais selvagens amostrados, porém mais alta em amostras provenientes de gatos-do-mato-grande.

Quanto aos genes relacionados a resistência em enterococos, os maiores índices para os genes *tetL*, *tetM* e *ermB* foram observadas em amostras de gatos-do-mato-grande

Para os genes relacionados a virulência, a maior incidência foi do gene *ace* e *geE*, ambos encontrados mais frequentemente nas amostras provenientes de gatos-do-mato-grande.

As elevadas ocorrências de suscetibilidade reduzida e de genes de virulência e resistência nos *Enterococcus* spp. isolados de amostras de *L. gymnocercus* e de *L. geoffroyi* selvagens, podem ser atribuídas tanto à ação antropogênica encontrada no habitat dos animais, quanto pela presença do resistoma ambiental.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*, 37:127-137.
- Aarestrup FM. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96, 271–281.
- Abat C, Raoult D, Rolain JM. 2016. Low level of resistance in Enterococci isolated in four hospitals, Marseille, France. *Microbial Drug Resistance*, 22: 218-222.
- Abdel-Moein KA, El-Hariri MD, Wasfy MO, Samir A. 2017. Occurrence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* carrying the *esp* gene in pet animals: an upcoming threat for pet lovers. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9: 115-117.
- Abriouel H, Omar NB, Molinos C, López RL, Grande MJ, Martínez-Viedma P, Ortega E, Cañamero MM, Galvez A. 2007. 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: 38-49.
- Aladarose BE, Said HS, Adbelmegeed ES. 2019. Incidence of Virulence determinants among enterococcal clinical isolates in Egypt and its association with biofilm formation. *Microbial Drug Resistance*. DOI: <
<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0320>>
- Allen HK, Cloud-Hansen KA, Wolinsk JM, Guan C, Greene S, Lu S, Boeyink M, Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. 2009. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA Cell Biology*. 28: 109–117.
- 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: 251 – 259.
- Almeida LB, Queirolo D, Oliveira TG, Beisiegel BM. **Avaliação de risco de extinção do gato-do-mato-grande *Leopardus geoffroyi***. 2013. Disponível em:

<www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/download/374/321>. Acessado em 20 de março de 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico sobre a RDC nº 20/ 2011.** Brasil, Brasília; 2011. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/Informe%20T%C3%A9cnico%20Pr ocedimentos%20RDC%20n%C2%BA%2020-2011.pdf>>. Acessado em: 08 de maio de 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Módulo IV.** 2014. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_4_2004.p df](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf)>. Acessado em 20 de março de 2019.

Araújo T, Ferreira C. 2013. The Genus *Enterococcus* as Probiotic: Safety Concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 457-466.

Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews – Microbiology*, 10: 266-78.

Austin DJ, Bonten MJ, Weinstein RA, Slaughter S, Anderson RM. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 6908-6913.

Bager A., Rosa CAD. 2010. Priority ranking of road sites for mitigating wildlife roadkill. *Biota Neotropica*, 10:149-153.

Bager F, Madsen M, Cristensen J, Asrestrup FM. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 31: 95-112.

Benenson S, Cohen MJ, Block C, Stern S, Weiss Y, Moses AE. 2015. Vancomycin-resistant Enterococci in long-term care facilities. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30: 786-789.

Billström H, Sullivan A, Lund B. 2008. Cross-transmission of clinical *Enterococcus faecium* in relation to esp and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 2115-2122.

- Bisceglia SBC, Pereira JA, Teta P, Quintana RD. 2011. Rodent selection by Geoffroy's cats in a semi-arid scrubland of central Argentina. *Journal of Arid Environments*, 75: 1024 – 1028.
- Borges BK, Risco GRM, Junior LDSM, Junior MVW, Aranonik M, Zuanazzi PT, Santos RBD, Cortes RX, Rocha RP, Feix RD, Kang TH. 2016. **RS em Números**. FEE - Fundação de Economia e Estatística. Porto Alegre.
- Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1148-1153.
- Brasil. Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. **Lex**: Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências. Brasília; 1969. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto-Lei/Del0467.htm>. Acessado em: 08 de maio de 2019.
- Brenden R, Janda JM. 1987. Detection, quantitation and stability of the haemolysin of *Aeromonas* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 24: 247-251.
- Bush K. 2010. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 558-564.
- Campos ACFB, Souza NR, Silva PHC, Santana AP. 2013. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33: 575-580.
- Canel D, Scioscia NP, Denegri GM, Kittlein M. 2016. Dieta do zorro gris pampeano (*Lycalopex gymnocercus*) em la província de Buenos Aires. *Mastozoología Neotropical*, 23 (2).
- Canepuccia AD, Martínez MM, Vassallo AI. 2006. Selection of waterbirds by Geoffroy's cat: Effects of prey abundance, size, and distance. *Mammalian Biology*, 72: 163-173.
- Cárdenas N, Arroyo R, Calzada J, Peirotén A, Medina M, Rodríguez J. 2016. Evaluation of technological properties of *Enterococcus faecium* CECT 8849, a strain isolated from human milk, for the dairy industry. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 100: 7665-7677.

- Carvalho J. 2011. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers of Biology*, 6: 357-366
- 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: 480-488.
- Castillo DF, Birochio DE, Lucherini M, Casanave EB. 2011. Diet of adults and cubs of *Lycalopex gymnocercus* in pampas grassland: A validation of the optimal foraging theory? *Annales Zoologici Fennici*, 48: 251-256.
- Choi JM, Woo GJ. 2015. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*, 70:476 – 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: 232-260.
- Clewell DB, Flanagan SE, Jaworski DD. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology*, 3: 229-236.
- CLSI - C. 2018. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testes - approved standard - twelve edition. P. Wayne, CLSI document M02-A11:32-58.
- Coburn PC, Gilmore S. 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 5:661-669.
- 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 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 135–138.
- Cohn LA, Gary AT, Fales WH, Madsen RW. 2003. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15: 338–343.
- Collignon PC, Conly JM, Andremont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, et al. 2016. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies

to Control Antimicrobial Resistance from Food Animal Production. *Clinical Infectious Diseases*, 63: 1087-1093.

Correia S, Porta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, 66: 551-559.

Costa LFX. 2018. **Caracterização de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de fezes de morcegos *Tadarida brasiliensis***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Costa PM, Vaz-Pires P, Bernardo F. 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, 40: 1735-1740.

Cruz P, Iezzi ME, Angelo C, Varela D, Bitetti MSD, Paviolo A. 2018. Effects of human impacts on habitat use, activity patterns and ecological relationships among medium and small felids of the Atlantic Forest. *PLoSOne*, 13: e0200806.

Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. 2014. **Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária**. Roca, São Paulo.

Curi NHDA, Araújo AS, Campos FS, Lobato ZIP, Gennari SM, Talamoni AS. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity Conservation*, 19: 3513-3524.

Cuyckens GAE, Pereira JA, Trigo TC, Silva MD, Gonçalves L, Huanaranca JC, Pérez NB, Cartes JL, Eizirik E. 2015. Refined assessment of the geographic distribution of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) (Mammalia: Felidae) in the Neotropics. *Journal of Zoology*, 298: 285 – 292.

Devriese L, Baele M, Butaye P. 2006. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*, 4: 163-174

Devriese LA, Colque JIC, Herdt PD, Haesebrouck F. 1992. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 421-425.

Devriese LA, van Kerckhove A, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH. 1987. Characterization and Identification of *Enterococcus* species isolated from the intestine of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 257 – 259.

- 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.
- 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: 1628-1635.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1628-1635.
- Echer R, Da Cruz JAW, Estrela CC, Moreira M, Gravato F. 2015. Usos da terra e ameaças para a conservação da biodiversidade no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. *Revista Thema* 12: 4 – 13.
- 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: DC23-DC25.
- Facklam RR. 1973. Comparison of Several Laboratory Media for Presumptive Identification of Enterococci and Group D Streptococci. *Journal of Applied Microbiology*, 26: 138-145.
- Faria-Corrêa M, Balbuena RA, Vieira EM, Freitas TRO. 2009. Activity, habit use, density, and reproductive biology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian Atlantic Forest, *Mammalian Biology* 74: 220-229.
- Farias A, Kittlein M. 2008. Small-scale spatial variability in the diet of pampas foxes (*Pseudalopex gymnocercus*) and human-induced changes in prey base. *The Ecological Society of Japan*, 23: 543-550.
- Fernandes MS, Fujimoto S, de Souza LP, Kabuki DY, da Silva MJ, Kuave AY. 2015. Dissemination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a ricotta processing plant and evaluation of pathogenic and antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Sciences* 80: M765–M775.
- Fernie DS, Healing TD. 1976. Wild bank voles (*Clethrionomys glariolus*) are possibly a natural reservoir of campylobacters (microaerophilic vibrios). *Nature*, 263: 496.

- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155: 1749-1757.
- Franz CMAP, Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47: 1–24
- 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: 365–370.
- Gao W, Howden BP, Stinear TP. 2018. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, 41: 76-82.
- Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, 2.
- Gibson JS, Cobbold RN, Heisig P, Sidjabat HE, Kyaw-Tanner MT, Trott DJ. 2010. Identification of Qnr and AAC (60)-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 143: 329-336.
- Gillings MR, Stokes HW. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 346-352.
- Gilmore M, Clewell D, Ike Y, Shankar N. 2014. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Gomes C, Martínez- Puchil S, Palma N, Horna G, Ruiz-Roldán L, Ruiz PJ. 2016. Macrolid resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin. *Critical reviews in microbiology*, 43.
- Goossens H. 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: Differences between the United States and Europe. *Infection control and hospital epidemiology*, 19: 546-551.
- Grassotti TT. 2018. ***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**. Dissertação

(Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto Ciências Biomédicas da Saúde, UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre.

- Gustafson RH, Bowen RE. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of applied microbiology*, 83: 531-541.
- Handwerger S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV, Murray BE, Wolff J, Walters B. 1993. Nosocomial Outbreak Due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clinical Infectious Diseases*, 16: 750-755.
- Huff R. 2018. **Determinação da relação clonal e fatores de virulência em enterococos isolados de imaturos de *Heliconius erato phyllis* (Lepdoptera – Nymphalidae)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. **Censo agropecuário**. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?=&t=o-que-e> >. Acessado em 20 de março de 2019.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3558-3565
- Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodrigues JM. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*, 13: 288.
- Jorge RSP, Rocha FL, Junior JAM, Morato RG. 2010. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis*, 14: 686-710.
- Junior NLT, Lane M. 1989. Wild mice as potential reservoirs of *Salmonella dublin* in a closed dairy herd. *Canadian Veterinary Journal*, 30: 590-592.
- Junior PS, Carvalho N, Mattos K, Santos ALQ. 2016. Brachial Plexus in the Pampas Fox (*Lycalopex gymnocercus*): A descriptive and Comparative Analysis. *The*

Anatomical Record Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 300: 537-548.

- Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T, Nickerson KW. 2000. Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. Applied Environmental Microbiology, 66: 4615–4619.
- Kayaoglu G, Orstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 15:308–320.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouelltte M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 37:3497-503
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. & Huebner, J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine, 22: 822–830.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. **Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance**. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Lauková A, Stropfová V, Simonová M, Styriak I, Swiecicka I. 2008. Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. Folia Microbiol, 53: 173-178.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Enterococcus diversity, origins in Nature, and Gut colonization**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>>. Acessado em 20 de março de 2019.
- Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Nöel, Molinas C, Derlot E, Arthur M, Duval J, Courvalin P. 1992. Resistance of enterococci to aminoglycoside and glycopeptides, 15: 495-501.
- Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. 2019. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. Journal of global antimicrobial resistance, 16: 36-47.

- LPSN **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acessado em: 20 de março de 2019.
- Lucherini M. 2016. *Lycalopex gymnocercus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/species/6928/85371194> >. Acessado em 20 de março de 2019.
- Manfredi C, Lucherini M, Canepuccia D, Casanave EB. 2004. **Geographical variation in the diet of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in Pampas Grassland of Argentina**. Journal of Mammalogy, 85: 1111-1115.
- 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: 291-304.
- Mansour N, Heine H, Abdou S, Shenana M, Zakaria M, El-Diwany A. 2014. Isolation of *Enterococcus faecium* NM113, *Enterococcus faecium* NM213 and *Lactobacillus casei* NM512 as novel probiotics with immunomodulatory properties. Microbiology and Immunology, 58: 559-569
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 65, de 21 de novembro de 2006**. Brasil; 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/INSTRUONORMATIVAN65.2006.pdf>>. Acessado em: 08 de maio de 2019.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle de Patógenos: Programa Nacional de Controle de Patógenos - PNCP**. Brasil; 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos>>. Acessado em: 08 de maio de 2019.
- 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: 59-65.

- 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.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12: 1221-1236.
- Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. 2016. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century, 30: 415-439.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Pampa – Conhecimentos e Descobertas.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>. Acesso em: 20 de março de 2019.
- Mo SS, Urdahl AM, Madslie K, Sunde M, Nesse LL, Slettemeas JS, Norström M. 2018. What does the fox say? Monitoring antimicrobial resistance in the environment using wild red foxes as an indicator. *PLoS ONE*, 13: e0198019.
- Moeller AH, Suzuki TA, Lin D, Lacey EA, Wasser SK, Nachman MW. 2017. Dispersal limitation promotes the diversification of the mammalian gut microbiota. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: 13768-13773.
- 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: 21501-21510.
- Montealegre MC, Singh KV, Murray BE. 2016. Gastrointestinal Tract Colonization Dynamics by Different *Enterococcus faecium* Clades. *The Journal of Infectious Diseases*, 213: 1914-1922.
- Monteiro G, Fleck J, Kluge M, Rech N, Soliman M, Staggemeier R. 2015. Adenoviruses of canine and human origins in stool samples from free-living pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyn thous*) in São Francisco de Paula, Rio dos Sinos basin. *Brazilian Journal of Biology*, 75: S11-S16.

- Moy TI, Mylonaskis E, Calderwood SB, Ausubel FM. 2004. Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 72: 4512-4520.
- MS - Ministério da Saúde. Portaria nº2616. 1998. **Lex:** Programa de Controle de Infecção Hospitalar. Brasil, 1998. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.htm>. Acessado em 07 de maio de 2019.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. 2000. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 13(4): 513-522.
- Murray BE. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 3: 46-65.
- 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: 235-241.
- Nascimento OF. 2014. On the morphological variation and taxonomy of the Geoffroy’s cat *Leopardus geoffroyi* (D’Orbigny & Gervais, 1844) (Carnivora, Felidae). *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*. 54. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/0031-1049.2014.54.11>>
- Nebreda T, Oteo J, Aldea C, Garcia-Estebanez C, Gastelu-Iturri J, Bautista V, Garcia-Cobos S, Campos J. 2007. Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 806–807.
- Ogier J, Serror P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 291-301.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **WHO Model List of Essential Medicines, 19th List**. 2015. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>>. Acessado em 20 de março de 2019.
- OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde. **Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviço de Saúde**. Brasil; 2005. Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&i

d=169:rede-nacional-do-monitoramento-e-controle-da-resistencia-microbiana-em-servicos-de-saude&Itemid=875>. Acessado em 08 de maio de 2019.

- Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, 13: 632-639.
- Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. 2007. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and Immunity*. 75:1861–1869.
- Pereira J, Lucherini M, Trigo T. 2015. *Leopardus geoffroyi*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/15310/50657011>>. Acessado em 20 de março de 2019.
- Pereira JA, Fracassi NG, Rago V, Ferreyra H, Marull CA, McAloose D, Uhart MM. 2010. Causes of mortality in a Geoffroy's cat population – a long-term survey using diverse recording methods. *European Journal of Wildlife Research*, 56: 939 – 942.
- Pereira JA. 2010. Activity pattern of Geoffroy's cats (*Leopardus geoffroyi*) during a period of food shortage. *Journal of Arid Environments*, 74: 1106 – 1109.
- Pereira RI. 2016. **Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no litoral norte do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- Pereira VC. 2014. Elementos para pensar a contribuição do Desenvolvimento Rural para conservação do bioma Pampa. *Mundo Agrario*, 15.
- Pillar VDP, Müller SC, Castilhos ZMDS, Jacques AVJ. 2009. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. MMA - Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Disponível em: <<http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Livros/CamposSulinos.pdf>>. Acessado em 20 de março de 2019.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. 2005. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Fecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine*, 52: 396-402.

- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi 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: 395-402.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1): 20-51.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. 2000. Macrolid resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 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.
- Putzer H, Laalami S. 2013. **Regulation of the Expression of Aminoacyl-tRNA Synthetases and Translation Factors.** Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6026/>>. Acessado em: 08 de maio de 2019.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13:151-171.
- 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: 26939-26945.
- Roberts MC, Schwartz S. 2016. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for agriculture, the environment and humans. *Journal of Environmental Quality*, 45: 576-592.
- Roberts, MC. 2002. Tetracycline Therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 462-467.
- Rodrigues J, Porta P, Martins A, Costa D. 2002. The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* Strains, with special reference to Vancomycin. *Journal of Veterinary Medicine*, 49: 278-280.

- Roesch LFW, Vieira FCB, Pereira VA, Schüemann AL, Teixeira IF, Senna AJT, Stefenon VM. 2009. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity*: 182 – 198.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, 12: 412–416.
- Santestevan NA, 2014. **Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* sp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 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*, 31:1935-1946.
- Santos JLC, Magalhães NB, Santos HAD, Robeiro RR, Guimarães MP. 2012. Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra Cipó National Park, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21: 270-277.
- Santos S, Silva LG. 2011. Mapeamento por imagens de sensoriamento remoto evidencia o bioma Pampa Brasileiro sob ameaça. *Boletim de Geografia*, 29: 49-57.
- Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resendes 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*: 25-31.
- Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resende, 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*, 25-31.

- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65: 725–759.
- Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. 2017. Can Maldi-tof mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends in Microbiology*, 25: 447-455.
- Schott D, Souza UA, Dall’Agnol B, Webster A, Doyle R, Peters F, Favarini M, Mazin F, Rosa AO, Jardim MMA, Trigo TC, Reck J. 2019. Detection of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ctenocephalides felis* fleas from free-ranging creab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). *Medical and Veterinary Entomology*. DOI: 10.1111/mve.12371.
- 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: 283 – 287.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. 2013. The Multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 4 (47): 1-13.
- Shankar N, Baghdayan AS, and Gilmore MS. 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, 417: 746–750.
- Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, and Johnson DE. 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 69: 4366–4372.
- 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: 193-200.
- Shepard BD, Gilmore MS. 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4: 215-224.
- Sheridan R, Mirable J, Hafler K. 2014. Determination of six illegal antibiotics in chicken jerky dog treats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 3690-3696.
- Sillero-Zubiri C, Hoffman M, MacDonald DW. 2004. **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

- Silva-Rodriguez E, Soto-Gamboa M, Ortega-Solís G, Jiménez J. 2009. Foxes, people and hens: human dimensions of a conflict in a rural area of southern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82: 375-386.
- Singh K V, Malathum K, Murray B E. 2001. Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 263–266
- Sousa KS, Bager A. 2007. Feeding habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in southern Brazil. *Mammalian Biology*, 73: 303 – 308.
- Souza VK, Dall'Agnol B, Souza UA, Webster A, Peters FB, Favarini MO, Mazim FD, Rocha FL, Tirelli FP, Soares JF, Jardim MMA, Trigo TC, Reck J. 2019. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canid from the Pampa biome, Brazil. *Parasitology Research*, 118: 1337-1342.
- Stepanhauskas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH, King CJ, McArthur JV. 2006. Co-selection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environment Microbiology*, 8: 1510-1514.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 2562-2566.
- Švec, P., & Devriese, L. 2010. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. D. Brenner, N. Krieg, & J. Staley. USA: Springer.
- Swecicka I. 2001. Protein profile and biochemical properties of *Bacillus circulans* isolated from intestines of small free-living animals in Poland. *Folia Microbiologica* 46:165-171.
- Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. 2014. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community – and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced drug delivery reviews*, 78: 3-13.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 72: 6032-6039.
- Thomas C M, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 711–72.

- Tirelli FP, Trigo TC, Trinca CS, Albano APN, Mazim FD, Queirolo D, Espinosa CC, Soares JB, Pereira JÁ, Crawshaw PG, MacDonald DW, Lucherini M, Eizirik E. 2018. Spatial organization and social dynamics of Geoffroy's cat in the Brazilian pampas. *Journal of Mammalogy*, 4:859-873.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. 2001. The Enterococcal surface protein, *esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4538-4545.
- Trigo F, Tirelli FP, Machado LF, Peters FB, Indrusiak CB, Mazin FD, Sana D, Eizirik E, Freitas TRO. 2013. Geographic distribution and food habits of *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* (Carnivora, Felidae) at their geographic contact zone in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. DOI: 10.1080/01650521.2013.774789.
- Varela O, Cormenzana-Méndez A, Krapovickas L, Bucher EH. 2008. Seasonal diet of the Pampas Fox (*Lycalopex gymnocercus*) in the Chaco Dry Woodland, Northwestern Argentina. *Journal of Mammalogy*, 89: 1012-1019.
- Vieira FM, Luque JL, Muniz-Pereira LC. 2008. Checklist of helminth parasites in the wild carnivore mammals from Brazil. *Zootaxa*, 1721: 1-23.
- Vien LTM, Minh NN, Thuong TC, Khuong HD, Nga TVT, Thompson C, Campbell JI, Jong M, Farrar JJ, Schultsz C, van Doorn HR, Baker S. 2012. The Co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of Vietnamese children. *Plos One*, 7: e42919.
- Weese JS. 2008. Antimicrobial resistance in companion animals. *Animal Health Research Reviews*, 9: 169-176.
- 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*, 45:3672–3673.
- Werner G, Klare I, Fleige C, Witte W. 2008. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin resistant enterococci and horizontal spread of *vanA* clusters. *International Journal of Medical Microbiology*, 298: 515–527.

- Willems R J, Homan W, Top J, Santen-Verheuveel M, Tribe D, Manziros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CM, Mascini EM, van Kregten E, van Embden JD, Bonten MJ. 2001. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet*, 357:853–855.
- Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279: 996–997.
- Ximenez A. 1975 Mammalian species – *Felis geoffroyi*. American Society of Mammalogists and Oxford University Press, 54: 1-4.
- Zhu W, Murray PR, Huskins WC, Jernigan JA, McDonald LC, Clark NC, Anderson KF, McDougal LK, Hageman JC, Olsen-Rasmussen M, et al. 2010. Dissemination of an Enterococcus Inc18-like vanA plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54: 4314–4320.