

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOLERÂNCIA A METAIS  
PESADOS EM *ENTEROCOCCUS sp.* ISOLADOS DE *Leopardus geoffroyi* DO  
SUL DO BRASIL: SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL.**

Amanda Ladeira Toigo

**Porto Alegre**

**2024**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOLERÂNCIA A METAIS PESADO  
EM *ENTEROCOCCUS sp.* ISOLADOS DE *Leopardus geoffroyi* DO SUL DO  
BRASIL: SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL.**

**Autor:** Amanda Ladeira Toigo

Trabalho apresentado à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para a  
obtenção da graduação em Medicina  
Veterinária

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

**Porto Alegre**

**2024**

### CIP - Catalogação na Publicação

Toigo, Amanda Ladeira  
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOLERÂNCIA A METAIS  
PESADOS EM ENTEROCOCCUS SPP. ISOLADOS DE LEOPARDUS  
GEOFFROYI. DO SUL DO BRASIL: SENTINELA DE POLUIÇÃO  
AMBIENTAL. / Amanda Ladeira Toigo. -- 2024.  
50 f.  
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto  
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Enterococcus sp.. 2. Gato-do-mato-grande. 3.  
Sentinela ambiental . 4. Bioma Pampa. I. Frazzon, Ana  
Paula Guedes, orient. II. Título.

**AMANDA LADEIRA TOIGO**

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOLERÂNCIA A METAIS PESADO  
EM *ENTEROCOCCUS SPP.* ISOLADOS DE *LEOPARDUS GEOFFROYI*. DO  
SUL DO BRASIL: SENTINELA DE POLUIÇÃO AMBIENTAL.**

Aprovado em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

APROVADO POR:

---

Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon  
Orientador e Presidente da Comissão

---

MSc. Nicole Vieira Stone  
Membro da Comissão

---

Dra. Flávia Pereira Tirelli  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe, meu pai, meu irmão, minha tia Dê e meus avós que me apoiaram todo esse tempo de graduação e acreditaram em mim, mesmo que por grande parte à distância. Com certeza, sem eles eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora, Ana Paula Frazzon, que além de orientadora foi, e vai continuar pra sempre sendo, uma mentora de vida com os seus ensinamentos diários de resiliência e fé. Obrigada por sempre me receber com um sorriso no rosto e por acreditar em mim. Sou muito grata por todos os ensinamentos e a enorme paciência ao longo dessa caminhada. Com a Ana nunca existe tempo ruim.

Às minhas colegas de laboratório que convivi durante todo esse período, Camila, Raquel, Larissa, muito obrigada por tantos momentos bons, tanta troca de energia e conhecimento e por todas as risadas compartilhadas. Vocês foram muito essenciais nessa caminhada, guardo vocês no meu coração e torço muito pelo sucesso de cada uma.

A todos os meus colegas de graduação, a faculdade se tornou um ambiente muito mais agradável simplesmente por ter vocês do meu lado. Sou eternamente grata pelos laços que construí ao longo de todo esse período. Cada um com a sua própria caminhada, mas com um amor em comum, os animais. Jú, Ana, Carol Decimo, Carol Pertile, Laira, Lala, vocês muito mais que apenas colegas, se tornaram minhas irmãs. Espero levá-las pra vida!

A todos os meus amigos que acompanharam esse processo e torceram por mim, muito obrigada! A vida sem vocês do meu lado não teria graça nenhuma.

Ao meu namorado, que mesmo de uma forma diferente, sempre esteve junto comigo desde o início da faculdade. Muito obrigada por todo o apoio de sempre Gui!

Por fim, mas não menos importante, gostaria de frisar a importância dos animais nessa caminhada. Eles, sem perceber, nos ensinam todos os dias a sermos resilientes e a como amar genuinamente.

Obrigada!

## RESUMO

O bioma Pampa, localizado no sul do Brasil, é uma das seis regiões biogeográficas do país e abriga uma rica biodiversidade, incluindo espécies, como o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*). No entanto, a expansão agrícola, pecuária e urbanização têm ameaçado seu ecossistema, substituindo campos naturais por monoculturas e criações de animais, além de introduzir pesticidas e antibióticos prejudiciais. Bactérias do gênero *Enterococcus* são usadas como bioindicadores ambientais nesse bioma devido à sua ampla distribuição e a capacidade de adquirir e transferir genes que conferem redução na sensibilidade a compostos tóxicos. O estudo objetivou avaliar a resistência a antibióticos e metais pesados a partir de amostras orais e retais de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*). Foram utilizadas 23 amostras de 14 animais diferentes, provenientes das duas fontes de coleta. O isolamento foi realizado utilizando meios de cultura seletivos e a identificação das espécies foi realizada pela técnica de MALDI-TOF. O perfil de suscetibilidade frente a 12 antimicrobianos foi testado pelo método de disco difusão, de acordo com o CLSI. Cepas com susceptibilidade reduzida para tetraciclina e eritromicina foram avaliadas por PCR (reação em cadeia da polimerase) para a presença dos genes *tetL* e *tetM*; e *msrC* e *ermB*, respectivamente. O perfil de tolerância a metais pesados foi determinado pela concentração inibitória mínima (CIM), utilizando ágar suplementado com arsenato de sódio nas concentrações de 8 e 16 mM. As cepas positivas fenotipicamente no arsenato de sódio foram submetidas à PCR para detectar a presença de genes associados a tolerância ao arsênio, como *arsA\_I* e *arsA\_II*. Para análise da presença de genes associados a tolerância ao cobre, foi realizado PCR em todas as cepas com a finalidade de avaliar a presença do gene *tcuB*. No total, 141 enterococos foram isolados e identificados para a espécie. Foi realizado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em 111 amostras, e selecionadas 81 amostras para eliminar possíveis clones. Nessas amostras, *E. faecium* foi mais frequente (42%), seguido de *E. faecalis* (30%), *E. casseliflavus* (11,1%), *E. hirae* (10%), *E. durans* (6,2%) e *E. mundtii* (1,2%). Quanto a suscetibilidade aos antimicrobianos, 80% das cepas apresentaram suscetibilidade reduzida a pelos menos um dos antimicrobianos, em que rifampicina foi o mais frequente com 44,4%, seguido por eritromicina (37%), ciprofloxacina (30,9%), tetraciclina (22,2%), norfloxacina (14,8%), vancomicina (12,3%), nitrofurantoína (7,4%), estreptomicina (3,7%), linezolida (2,5%) e ampicilina e cloranfenicol (1,2%). Dentre os 30 isolados resistentes à eritromicina, 43,3% possuíam o gene *msrC* e apenas 1,3% o gene *ermB*. Já para os 18 isolados resistentes à tetraciclina, 77% apresentou algum dos genes testados (*tetL* e *tetM*). Todas as 81 cepas foram

analisadas quanto a concentração mínima inibitória (CIM) para o arsênio em duas concentrações, 8 e 16mM, em que 6 apresentaram um fenótipo resistente. As cepas positivas foram testadas para os genes *asrA\_I* e *arsA\_II*, porém não se obteve resultados positivos. Para análise da presença a análise da presença do gene *tcrB*, que confere resistência ao cobre, foi realizado PCR em todas as amostras, e o resultado foi negativo em todas. Em conclusão, as amostras avaliadas de gatos-do-mato-grande apresentam perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados, possivelmente provenientes do impacto das atividades humanas no ecossistema desses animais.

Palavras-chave: gato-do-mato-grande, enterococos, bioindicadores, antimicrobianos, metais pesados.

## ABSTRACT

The Pampa biome, located in southern Brazil, is one of the country's six biogeographical regions and hosts a rich biodiversity, including species like Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*). However, agricultural expansion, livestock farming, and urbanization have threatened its ecosystem, replacing natural fields with monocultures and animal farming, and introducing harmful pesticides and antibiotics. Bacteria of the genus *Enterococcus* are used as environmental bioindicators in this biome due to their widespread presence and ability to acquire and transfer genes that confer reduced sensitivity to toxic compounds. This study aimed to assess antibiotic and heavy metal resistance from oral and rectal samples of Geoffroy's cats (*L. geoffroyi*). A total of 23 samples from 14 different animals, sourced from both collection points, were used. Isolation was performed using selective culture media, and species identification was conducted using the MALDI-TOF technique. Susceptibility profiles against 12 antimicrobials were tested using the disk diffusion method according to CLSI standards. Strains with reduced susceptibility to tetracycline and erythromycin were evaluated by PCR (polymerase chain reaction) for the presence of *tetL* and *tetM* genes, and *msrC* and *ermB* genes, respectively. The heavy metal tolerance profile was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) using agar supplemented with sodium arsenate at concentrations of 8 and 16 mM. Strains phenotypically positive for sodium arsenate were subjected to PCR to detect the presence of genes associated with arsenic tolerance, such as *arsA\_I* and *arsA\_II*. To analyze the presence of genes associated with copper tolerance, PCR was performed on all strains to assess the presence of the *tcrB* gene. In total, 141 enterococci were isolated and identified to the species level. Antimicrobial susceptibility profiles were determined for 111 samples, and 81 samples were selected to eliminate possible clones. Among these samples, *E. faecium* was the most frequent (42%), followed by *E. faecalis* (30%), *E. casseliflavus* (11.1%), *E. hirae* (10%), *E. durans* (6.2%), and *E. mundtii* (1.2%). Regarding antimicrobial susceptibility, 80% of the strains showed reduced susceptibility to at least one of the antimicrobials, with rifampicin being the most frequent at 44.4%, followed by erythromycin (37%), ciprofloxacin (30.9%), tetracycline (22.2%), norfloxacin (14.8%), vancomycin (12.3%), nitrofurantoin (7.4%), streptomycin (3.7%), linezolid (2.5%), and ampicillin and chloramphenicol (1.2%). Among the 30 erythromycin-resistant isolates, 43.3% harbored the *msrC* gene, and only 1.3% the *ermB* gene. Of the 18 tetracycline-resistant isolates, 77% presented one of the tested genes (*tetL* and *tetM*). All 81 strains were analyzed for minimum inhibitory concentration (MIC) for arsenic at



two concentrations, 8 and 16 mM, with six showing a resistant phenotype. The positive strains were tested for the *arsA\_I* and *arsA\_II* genes, but no positive results were obtained. To analyze the presence of the *tcrB* gene, which confers copper resistance, PCR was performed on all samples, and all tested negative. In conclusion, the samples from Geoffroy's cats exhibited antimicrobial and heavy metal resistance profiles, possibly due to the impact of human activities on these animals' ecosystems.

Keywords: wild cat, enterococci, bioindicators, antimicrobials, heavy metals

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mapa do Rio Grande do Sul delimitando a região composta pelo Bioma da Mata Atlântica (verde) e pelo Bioma Pampa (amarelo). Fonte: IBGE e MMA – 2004.....14
- Figura 2 - Distribuição do gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*). Fonte: IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) 2015. <https://www.iucnredlist.org/>.....16
- Figura 3 - Fotografia de um gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*). Fonte: Felipe Peters.....17
- Figura 4 - Localização do distrito de Candiota no estado do Rio Grande do Sul onde os animais foram capturados Fonte: Fonte: IBGE, 2022.....28
- Figura 5 - Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada para a totalidade de cepas isoladas das amostras de gatos-do-mato-grande.....35
- Figura 6 - Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das 81 amostras coletadas de gatos-do-mato-grande.....36
- Figura 7 - Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das amostras coletadas da boca de gatos-do-mato-grande.....39
- Figura 8 - Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das amostras coletadas do ânus de gatos-do-mato-grande.....41
- Figura 9 - Gráfico em pizza representando as cepas que apresentaram CIM de 16mM.....44
- Figura 10 - Gráfico em pizza representando as cepas que apresentaram CIM > 16mM.....44

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Descrição das amostras coletadas de gatos-do-mato-grande.....  | 27 |
| Tabela 2 - Parâmetros adotados para detectar genes de resistência aos metais pesados arsênio e cobre e aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina em <i>Enterococcus</i> sp. por reação em cadeia da polimerase..... | 32 |
| Tabela 3 – Resultado do isolamento de <i>Enterococcus</i> sp. de amostras de gatos-do-mato-grande.....  | 34 |
| Tabela 4 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande.....  | 37 |
| Tabela 5 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes da boca de gatos-do-mato-grande.....  | 40 |
| Tabela 6 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes do ânus de gatos-do-mato-grande.....  | 42 |
| Tabela 7 – Resultado da presença de genes que conferem redução na suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina em amostras de gatos-do-mato-grande.....   | 43 |

## LISTA DE SIGLAS

|          |  |
|----------|--|
| ABR      | Resistência a Antibióticos   |
| ATP      | Adenosina Trifosfato   |
| BHI      | Ágar Infusão Cérebro Coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )             |
| CEUA     | Comissão de Ética no Uso dos Animais                                     |
| CLSI     | Clinical and Laboratory Standards Institute                              |
| (Cu)     | Símbolo do Elemento Químico Cobre  |
| DNA      | Ácido Desoxirribonucleico  |
| ICMBio   | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade                  |
| IBAMA    | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IBGE     | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                          |
| MeT      | Mecanismo de Tolerância a Metais Pesados                                 |
| MIC      | Concentração Mínima Inibitória   |
| MULTI-SR | Multi-Sensibilidade Reduzida   |
| OMS      | Organização Mundial da Saúde   |
| PCR      | Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )      |
| RNA      | Ácido Ribonucleico   |
| SEMA     | Secretaria Estadual do Meio Ambiente                                     |
| SNUC     | Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza                  |
| SR       | Suscetibilidade Reduzida   |
| TBE      | Tampão Tris Ácido-Bórico EDTA  |
| TGI      | Trato Gastrointestinal   |
| UFC      | Unidade Formadora de Colônia   |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 14 |
| 2.1 Bioma Pampa.....  | 14 |
| 2.2 Felinos do Pampa e Gato-do-mato-grande ( <i>Leopardus geoffroyi</i> ) .....   | 15 |
| 2.3 Projeto de conservação dos Felinos do Pampa.....  | 17 |
| 2.4 Bioindicadores.....   | 18 |
| 2.5 Características do gênero <i>Enterococcus</i> sp.....   | 19 |
| 2.6 Resistência aos antimicrobianos, problema de Saúde Única.....   | 20 |
| 2.7 Resistência aos antimicrobianos em enterococos.....   | 21 |
| 2.7.1 Mecanismo de resistência aos macrolídeos (eritromicina).....  | 21 |
| 2.7.2 Mecanismo de resistência a tetraciclina.....  | 21 |
| 2.8 Metais pesados e atividades antrópicas.....   | 22 |
| 2.9 Resistência a metais pesados em bactérias.....  | 23 |
| 2.9.1 Mecanismo de resistência ao Arsênio (As) em enterococos.....  | 23 |
| 2.9.2 Mecanismo de resistência ao Cobre (Cu) em enterococos.....  | 24 |
| 3. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 26 |
| 3.1 Coleta amostral.....  | 26 |
| 3.2 Área de estudo.....   | 27 |
| 3.2.1 Pampa brasileiro – município de Candiota.....   | 27 |
| 3.3 Isolamento das bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> sp.....  | 28 |
| 3.4 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> .....   | 29 |
| 3.5 Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....  | 30 |
| 3.6 Determinação do perfil de suscetibilidade a metais pesados.....   | 30 |
| 3.7 Extração do DNA genômico e detecção dos genes relacionados à resistência aos<br>antimicrobianos e metais pesados..... | 31 |
| 4. <b>RESULTADOS</b> .....  | 33 |
| 5. <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 46 |
| 6. <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 50 |
| 7. <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 51 |

## 1. INTRODUÇÃO

O bioma Pampa é um dos seis biomas que o Brasil possui. Apresenta paisagens naturais únicas, como serras, planícies, coxilhas e compõe grande parte do cenário geográfico do Rio Grande do Sul. Nele, inúmeras espécies vegetais e animais habitam, com mais de 500 espécies de aves e mais de 100 espécies de mamíferos terrestres, abriga ainda muitas espécies exclusivas do bioma, como o Tuco-tuco-das-dunas (*Ctenomys flamarioni*), o sapinho-de-barriga-vermelha (*Melanophryniscus atroluteus*) e o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*).

Apesar do importante papel na conservação da biodiversidade, o Pampa vem sofrendo os impactos do avanço da fronteira agrícola e pecuária, além da constante e crescente urbanização da região. Grande parte dos campos antes habitados por inúmeras espécies, hoje em dia comportam monoculturas vegetais e criações de animais para a pecuária, ameaçando espécies nativas que vem perdendo o seu espaço. As atividades agrícolas utilizam-se de produtos nocivos ao meio ambiente, como pesticidas e antibióticos, que ao longo do tempo vão se acumulando na natureza e causando inúmeras consequências.

Em vista desse cenário, os impactos dessas atividades nos organismos naturais deste bioma vêm sendo amplamente discutidos e monitorados. O monitoramento ambiental emprega bioindicadores, que são seres vivos de natureza diversa, que permitem avaliar a qualidade do meio ambiente e ajudam a perceber as consequências das intervenções humanas na natureza. Nos últimos anos bactérias do gênero *Enterococcus* sp. vem sendo utilizadas como sentinelas ambientais para avaliação da presença de antibióticos e metais pesado, devido a sua ubiquidade (presentes no solo, na água, nos alimentos e na microbiota intestinal de diversos animais como em humanos, morcegos, tartarugas marinhas e alguns insetos) e sua capacidade de adquirir e transferir genes que conferem redução na sensibilidade a antimicrobianos, importante fator de análise para estudos de contaminação ambiental.

Por isso, em vista da presença de felinos selvagens da espécie gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) na região do bioma Pampa, o presente trabalho objetivou avaliar a resistência a antimicrobianos e a tolerância a metais pesados em *Enterococcus* spp. isolados da microbiota gastrointestinal e oral de *Leopardus geoffroyi* no sul do Brasil, como intuito de utilizar esses microrganismos como bioindicadores de poluição ambiental nos habitats dessa espécie.

A hipótese deste estudo é de que *Enterococcus* spp. isolados de *Leopardus geoffroyi* apresentam elevados níveis de resistência a antimicrobianos e tolerância a metais pesados, refletindo a contaminação ambiental dos habitats em que esses felídeos vivem.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bioma Pampa

Com uma área de aproximadamente 700.000 km<sup>2</sup>, o bioma Pampa ocupa porções dos territórios do Brasil, Argentina e Uruguai (Bilenca & Miñarro, 2004). No território brasileiro, o Pampa é exclusivo do estado do Rio Grande do Sul abrangendo cerca de 176.000 km<sup>2</sup>, equivalendo a 63% do território gaúcho e a 2.1% do território nacional (Figura 1) (IBGE, 2004).

Figura 1 - Mapa do Rio Grande do Sul delimitando a região composta pelo Bioma da Mata Atlântica (verde) e pelo Bioma Pampa (amarelo)



Fonte: IBGE e MMA - 2004

A paisagem da região é marcada por extensas áreas de planície, algumas colinas conhecidas como coxilhas com vegetação de campo e áreas com arbustos, matas de galeria, além de regiões de planalto, especialmente onde predominam espécies arbustivas. O Pampa possui um vasto patrimônio cultural, que ainda é pouco conhecido e valorizado. A sua biodiversidade é composta de diversas espécies endêmicas, tanto vegetais, quanto animais. Os campos possuem uma diversidade extraordinária de gramíneas e leguminosas, com muitas espécies exclusivas desse bioma. Estima-se que 100 espécies de mamíferos e cerca de 500 espécies de aves habitam o Pampa. No contexto de clima global, o campo nativo tem importância fundamental, semelhante às florestas, com uma importante contribuição no sequestro e manutenção de carbono no solo (Pillar & Lange, 2015).



Apesar de sua grande importância para a conservação da biodiversidade brasileira, o Pampa é subvalorizado, provavelmente essa desvalorização se dá ao fato de não possuir uma cobertura florestal exuberante, apesar de sua vegetação nativa possuir uma riqueza extraordinária. Estimativas indicam uma significativa perda de hábitat, com apenas 41,32% da vegetação nativa remanescente em 2002, diminuindo para 36,03% em 2008 (CSR/IBAMA, 2010). Em relação às áreas naturais protegidas no Brasil, o Pampa é o bioma menos representado no Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), com apenas 0,4% da área continental brasileira protegida por unidades de conservação. O seu acelerado processo de degradação do bioma ocorre principalmente devido ao avanço da expansão agrícola, em especial ao desenvolvimento intenso das áreas de cultivo de soja e de eucalipto, que degradam fortemente as vegetações nativas. Além disso, o crescente desenvolvimento urbano também ameaça a biodiversidade do local (Pillar et al., 2009).

## **2.2 Felinos do Pampa e Gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)**

No bioma Pampa ainda existe a presença de oito espécies de felídeos selvagens das 11 que ocorrem no Brasil (Abreu et al., 2020), demonstrando sua relevância para a conservação da biodiversidade. Dentre esses animais que habitam a região, o bioma abriga algumas espécies consideradas residentes, como o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*); gato-maracajá (*Leopardus wiedii*); gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) e gato-palheiro-pampeano (*Leopardus munoai*) (Oliveira et al., 2005).

O gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) também conhecido como gato-crioulo, gato-jaguaritica, gato-bagual ou gato-oveiro, pertencente à família Felidae, é um felino selvagem endêmico do sul da América do Sul, exclusivo da região do bioma Pampa no território brasileiro (Figura 2). É uma espécie que ocorre desde o sul da Bolívia até o sul da Argentina e do Chile, onde no Brasil, é encontrado majoritariamente no estado do Rio Grande do Sul (Cuyckens et al., 2016). São animais de hábitos noturnos e solitários (Ximénez, 1973), comumente encontrados em áreas florestais, com cobertura vegetal mais densa, ou totalmente campestres, incluindo regiões antropizadas, como campos de lavouras de arroz e soja, além da periferia de grandes cidades (Mazim, 2015; Manfredi et al., 2004; Trigo et al., 2013; Tirelli et al., 2018).

Figura 2 - Distribuição do gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) no território da América do Sul



Fonte: IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2015.

O gato-do-mato-grande possui tamanho similar ao do gato doméstico, pode apresentar a coloração amarelo-acinzentada com pintas pretas sólidas ou a coloração toda preta (Figura 3) (Pereira et al., 2015). A dieta de *L. geoffroyi* consiste basicamente em vertebrados, em que as suas principais presas são mamíferos, principalmente pequenos roedores, mas também répteis, anfíbios e peixes, apesar dos registros destes últimos grupos serem baixos (Manfredi et al., 2004; Sousa & Bager, 2008; Pereira et al., 2012; Trigo et al., 2013; Migliorini et al., 2018). No Pampa brasileiro observou-se um padrão na dieta da espécie, com uma vasta variedade de espécies, como Gruiformes, Passeriformes e Anura, mas o item de maior importância sendo sempre a preá *Cavia aperea* (Sousa & Bager, 2008; Trigo et al., 2013; Migliorini et al., 2018). A proximidade com áreas antropizadas, resultante da perda de habitat e da fragmentação de florestas para fins agropecuários, tem exposto cada vez mais os felinos a ambientes urbanizados, o que impacta negativamente suas populações (Schonewald-Cox & Buechner, 1992). A poluição de fontes de água, como rios e lagos, por rejeitos de esgoto e atividades agrícolas, representa uma séria ameaça para essas espécies, ao expô-las a resíduos humanos tóxicos. A remoção direta de indivíduos, seja por atropelamentos, caça retaliatória devido à

predação de animais domésticos, envenenamento, entre outros fatores também contribui para o declínio populacional (Pereira et al., 2015; Peters et al., 2016; Tirelli et al., 2019). Globalmente, o gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) está classificado pelo Livro Vermelho da IUCN, a União Internacional para a Conservação da Natureza, como "Pouco Preocupante", portanto, apesar de todas as ameaças que a espécie sofre, não há grandes riscos de extinção ainda (RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Devido a ampla distribuição desses animais na região do Rio Grande do Sul, torna-se essencial monitorá-los para entender seus hábitos, avaliar possíveis flutuações populacionais e os impactos das atividades humanas na vida selvagem. Esse monitoramento é crucial para a conservação das espécies e para a mitigação dos danos causados pelo avanço da urbanização e agricultura (Pereira et al., 2010).

Figura 3 - Fotografia de um gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*)



Fonte: Felipe Peters, 2022

### 2.3 Projeto de conservação dos Felinos do Pampa

O Projeto Felinos do Pampa é um projeto de conservação e pesquisa pertencente ao Instituto Pró-Carnívoros, que visa a coexistência harmônica entre humanos e felinos silvestres ao longo dos ecossistemas integrados ao Bioma Pampa. O grupo atua em todo o bioma e já registrou cerca de 40 espécies de mamíferos silvestres, onde foi possível verificar quatro espécies de pequenos felinos silvestres (<https://procarnivoros.org.br/projeto-felinos-do-pampa/>). As espécies gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*); gato-maracajá (*L. wiedii*); gato-mourisco (*H. erpailurus yagouaroundi*) e gato-palheiro-pampeano (*Leopardus munoai*) podem ser consideradas residentes, porém estão praticamente todas ameaçadas de extinção, segundo a última atualização da avaliação regional da Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SEMA) (RIO GRANDE DO SUL, 2014)

O grupo promove várias ações conservacionistas que visam atenuar ou mitigar os principais impactos locais que incidem sobre os felinos silvestres do Pampa. Entre os impactos que podem gerar a extinção da espécie, ela destaca a fragmentação de habitat, a caça por retaliação, os atropelamentos e as interações negativas com gatos e cachorros domésticos. Essa pesquisa ocorre através do monitoramento dos felinos expostos aos impactos e, para isso, são utilizadas a telemetria GPS, armadilhas fotográficas, censos rodoviários e ciência cidadã, visando abordagens tecnológicas, genéticas e sanitárias.

Para minimizar os atropelamentos, são localizados os pontos críticos e instaladas placas de sinalização, outdoors educativos ou cercas e passagens subterrâneas (quando possível). Além disso, eles atuam também com campanhas de vacinação, castração e tutela responsável, reparando e reconstruindo canis para diminuir a circulação de animais domésticos em ambientes naturais. Para tentar frear a perda de habitat desses animais, são realizados planos de manejo e programas ambientais direcionados e empreendimentos que passam pela necessidade de licenças ambientais para operar.

### 2.4. Bioindicadores

Bioindicadores são organismos ou comunidades biológicas que refletem as condições ambientais de um determinado ecossistema, sendo utilizados para monitorar a saúde e a qualidade desse ambiente, especialmente em relação à poluição e mudanças ecológicas. Um exemplo disso são as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Lactococcus lactis*, que

vem sendo estudadas nos últimos anos em análises sobre os impactos antropogênicos na natureza, devido aos seus mecanismos de tolerância a substâncias tóxicas, como metais pesados, através do recrutamento desses genes (Silver, 1996; Seco 2010).

Estudos utilizando as bactérias enterococos vêm crescendo cada vez mais devido a sua capacidade de expressar proteínas de estresse úteis para monitorar poluentes tóxicos, o seu potencial de crescimento rápido e da resiliência em diversas condições ambientais (como pH, temperatura, fome) (Byappanahalli et al., 2012; Gaca e Lemos, 2019). Este gênero já foi alvo de muitos estudos que avaliaram a diversidade e a resistência a antimicrobianos de enterococos presentes em animais silvestres, além do uso como bioindicadores da saúde animal e do ecossistema em ambientes possivelmente contaminados por metais pesados (Aktan et al., 2013; da Silva et al., 2012; Niederhäusern et al., 2013; Novais et al., 2018; Rebelo et al., 2021; Ture et al., 2018; Vignaroli et al., 2018).

## **2.5 Características do gênero *Enterococcus* sp.**

O gênero *Enterococcus* pertence à família Enterococcaceae, caracterizado por bactérias Gram positivas, as quais possuem morfologia celular de cocos e podem ser encontrados de forma isolada, aos pares ou em cadeias curtas (Gilmore et al., 2014). São organismos anaeróbios facultativos, não possuem enzimas citocromáticas e, portanto, testam negativo ao teste da catalase (Murray, 1990). São microrganismos ubíquos, os quais toleram condições ambientais adversas, como uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 50°C), altas concentrações de NaCl (6,5%) e variações de pH (4,6 a 9,9). Tais características, aliadas à capacidade de adquirir uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos, tem configurado um grande desafio para a área clínica, devido às infecções patológicas. Entretanto, também devido à essas características, o gênero tem desempenhado papéis importantes, na medida em que estão sendo utilizados frequentemente como sentinelas ambientais (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009).

Este gênero compõem um diverso, complexo e importante grupo de bactérias amplamente distribuídas no ambiente. São considerados comensais nos tratos gastrointestinal e genitourinário, cavidade oral de humanos e animais (Santestevan et al., 2015; Prichula et al., 2016; Grassoti et al., 2018), porém, também podem ser encontrados no solo, água e alimentos. Embora algumas linhagens sejam utilizadas na manufatura de alimentos, como alimentos fermentados tradicionais e produtos lácteos (Lebreton et al., 2014), outros isolados podem causar infecções graves em humanos e animais (Giraffa, 2002).

O gênero inclui, de acordo com evidências moleculares e filogenéticas, mais de 80 espécies, sendo *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii* as espécies frequentemente encontradas no trato gastrointestinal de animais (Lebreton et al., 2014; Grassotti et al., 2018; Huff et al., 2020; Oliveira de Araújo et al., 2020; da Silva Heck et al., 2021).

Espécies como *E. faecalis* e *E. faecium* têm recebido crescente atenção devido ao aumento na frequência de cepas resistentes a antimicrobianos, especialmente em infecções adquiridas em ambientes hospitalares (Lebreton et al., 2014). A disseminação de bactérias resistentes representa uma ameaça ao meio ambiente e também aos animais que habitam áreas contaminadas, particularmente aqueles próximos a grandes centros urbanos, reforçando a importância da abordagem de Saúde Única na avaliação e controle dessas resistências. Essa situação torna-se ainda mais preocupante quando bactérias comensais resistentes a antimicrobianos são detectadas em populações de animais selvagens (Santestevan et al., 2015; Prichula et al., 2016; Grassotti et al., 2018; Oliveira de Araujo, 2020).

## **2.6 Resistência aos antimicrobianos, problema de Saúde Única**

A descoberta dos antimicrobianos trouxe melhorias significativas para a qualidade de vida de pessoas e animais. Esses medicamentos diminuem a taxa de mortalidade e a incidência de doenças, pois facilitam a recuperação pós-cirúrgica e evitam infecções em pacientes com sistema imunológico enfraquecido. Além disso, contribuem para a longevidade dos animais domésticos e melhoram a eficiência da produção animal. No entanto, o uso inadequado e excessivo de antibióticos, juntamente com sua liberação no meio ambiente, exerce pressão seletiva sobre as bactérias, gerando preocupações crescentes com a disseminação da resistência, o que afeta tanto a saúde humana quanto o ecossistema natural (Grenni et al., 2018; García et al., 2022).

Segundo D'Costa (2011), a resistência antimicrobiana é um fenômeno muito mais antigo do que pensamos, estudos indicam que a origem dos antibióticos provenientes de produtos naturais varia de 2 bilhões a 40 milhões de anos atrás, indicando que as bactérias já haviam desenvolvido mecanismos contra toxinas ou compostos naturalmente encontrados em seu ambiente (Sengupta et al., 2013; García et al., 2022). Isto é, as bactérias possuem genes com mecanismos de resistência intrínsecos que conferem redução na sensibilidade a antimicrobianos encontrados no ambiente, caracterizados como resistoma ambiental (Poole, 2005; Sengupta et al. 2013). Além da resistência intrínseca, que permite transmitir genes de forma vertical à prole,

os microrganismos podem desenvolver resistência adquirida aos antimicrobianos, que ocorre por meio de mudanças estruturais e/ou bioquímicas na célula bacteriana, resultantes de alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas, como os plasmídeos (De Sá Del Fiol et al., 2000).

Apesar de todas as evoluções que a descoberta dos antimicrobianos trouxeram para a humanidade, melhorando a qualidade de vida de humanos e animais, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2021, a resistência antimicrobiana foi considerada uma das 10 maiores ameaças globais à saúde pública que a humanidade enfrenta (OMS, 2021). O fim da suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos é uma ameaça antropogênica global que afeta humanos, animais e o meio ambiente, sendo este último considerado um importante veículo para a transmissão da resistência antimicrobiana (Hernando-Amado et al., 2020).

## **2.7 Resistência aos antimicrobianos em enterococos**

A resistência a várias classes de agentes antimicrobianos é uma característica marcante dos enterococos (Kristich et al., 2014). O microambiente do trato gastrointestinal (TGI), habitat comumente colonizado pelo gênero *Enterococcus*, possui uma abundância de microrganismos, tornando bastante favorável a ocorrência de transferências gênicas e aquisição de elementos móveis entre diferentes espécies de bactérias (Hollenbeck; Rice, 2012). Cepas resistentes ao antimicrobiano eritromicina, pertencente ao grupo dos macrolídeos, e à tetraciclina, tem sido descrito em cepas isoladas de amostras clínicas, ambientais e animais (Munita & Arias, 2016).

### **2.7.1 Mecanismo de resistência aos macrolídeos (eritromicina)**

Representantes da classe dos macrolídeos são agentes bacteriostáticos, caracterizados pela presença de lactonas macrocíclicas de origem poliketídica de 14 ou 16 membros, ligadas a um açúcar e um amino-açúcar. Atuam pela ligação com a subunidade 23S do RNA ribossomal 50S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas (Guimarães et al., 2010).

Os macrolídeos são um grupo de antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções respiratórias como pneumonia, sinusite aguda e faringites (Guimarães et al., 2010). A eritromicina é o principal representante da classe e possui baixo custo, o que muitas vezes é um importante fator na escolha para o combate aos microrganismos, principalmente em países com uma população de baixo poder econômico (Zbiden, 2006).

Com a crescente utilização desses antimicrobianos para os mais diversos fins, os enterococos desenvolveram algumas formas de resistência, dentre elas, a principal foi utilizando o mecanismo de modificação do alvo ribossômico, a partir da metilação de resíduos específicos da subunidade 23S. Esse processo é mediado pelos genes *erm*, como por exemplo o *ermB*, onde a metilação altera o local de ligação dos macrolídeos, impedindo a sua ligação (Roberts et al., 2002). Além disso, outra forma de resistência desenvolvida foi utilizando o sistema bomba de efluxo pelos genes *mef* e *msr*, tornando-o menos eficaz (Portillo et al., 2000).

### 2.7.2 Mecanismo de resistência a tetraciclina

As tetraciclinas são antibióticos poliketídicos bacteriostáticos de amplo espectro, e se ligam a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, impedindo a síntese protéica (Pereira-Maia et al., 2010). Este antibiótico é bastante eficaz frente a diversas bactérias aeróbias e anaeróbias, tanto gram-positivas, como gram-negativas, muito utilizada no tratamento de infecções dos tratos gastrointestinal e respiratório (Roberts & Schwartz, 2016).

Desde a descoberta da clortetraciclina, a primeira tetraciclina identificada, vários outros derivados foram descobertos. Dentre eles, encontram-se a minociclina e a doxiciclina, amplamente utilizadas no Brasil. Além de suas aplicações médicas, as tetraciclinas foram extensivamente utilizadas na agricultura como promotores de crescimento em animais de criação, uma prática que contribuiu significativamente para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Chopra & Roberts, 2001; Nelson, 2011)

Os enterococos apresentam resistência às tetraciclinas principalmente por meio da aquisição de genes que codificam proteínas de efluxo e proteínas de proteção ribossômica. Os genes de resistência mais frequentemente encontrados são o *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(O)* e *tet(K)*. O gene *tet(M)*, que é frequentemente encontrado em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, codifica uma proteína que protege o ribossomo, ligando-se a ele e alterando sua conformação, o que impede a ligação eficaz das tetraciclinas (Roberts, 1996; Connel, 2003). Por outro lado, os genes *tet(L)*, *tet(O)* e *tet(K)* codificam proteínas que funcionam como bombas de efluxo, expulsando ativamente as tetraciclinas da célula bacteriana, reduzindo assim a concentração intracelular do antibiótico e, conseqüentemente, sua eficácia (Chopra & Roberts, 2001).

## 2.8 Metais pesados e atividades antrópicas



Os metais pesados referem-se a um grande grupo de oligoelementos com densidade relativamente elevada (AGARWAL, 2009), os quais não são biodegradáveis como a matéria orgânica, portanto, eles persistem no ambiente a longo prazo. Muitos metais são biologicamente essenciais, intrínsecos da natureza, porém tornam-se perigosos quando ocorre o aumento da sua concentração (LIMA, 2016)

Atividades antrópicas como a mineração e a agricultura, tem o potencial de dispersar esses elementos inadequadamente na natureza, a partir, principalmente, do escoamento da água (Seiler & Berendonk, 2012; Yu et al., 2017). Rações suplementadas com cobre e zinco são usadas em atividades agrícolas e agropecuárias como promotores de crescimento, visto que seus compostos químicos também possuem atividade antimicrobiana (Antunes et al., 2003). Por isso, como justificativa para reduzir o uso de antibióticos nestes setores, o uso de compostos contendo metais pesados vem crescendo.

No que se refere ao Brasil, a poluição ambiental por metais pesados é um problema emergente que causa impactos à saúde humana e aos ecossistemas. Tanto os ambientes terrestres, quanto os aquáticos, são afetados e atingem a fauna animal, desencadeando múltiplos efeitos, prejudicando o sistema nervoso, a reprodução, o comportamento, a defesa antioxidante, entre outras funções. As atividades econômicas praticadas no país são as principais responsáveis pelo problema, tendo em vista a estrutura industrial diversificada e do importante papel na agricultura, o Brasil apresenta diversas fontes que contribuem para a intensificar a contaminação, como a poluição veicular, resíduos industriais, atividades mineradoras, uso e produção de pesticidas, entre outras atividades (Ellwanger e Chies, 2023).

## **2.9 Resistência a metais pesados em bactérias**

Os metais pesados são mais estáveis e resistentes à degradação do que antibióticos, tornando o seu tempo de exposição no ambiente maior e possibilitando a bioacumulação ambiental e conseqüente toxicidade em todos os níveis tróficos. Em vista disso, as bactérias desenvolveram mecanismos de tolerância a metais (MeT) a partir da aquisição dos genes MeT, frequentemente localizados em elementos genéticos móveis que também contêm genes que codificam resistência a antibióticos (ABR) (Argudín et al., 2019).

### **2.9.1 Mecanismo de resistência ao Arsênio (As) em enterococos**

Como o metal pesado arsênio não é um componente essencial à vida, não pertencente a mecanismos de funcionamento celular, porém, está presente no ambiente, os microrganismos desenvolveram mecanismos de desintoxicação, envolvendo principalmente sistemas de transporte capazes de expelir arsenito das células (Rosen & Liu, 2009). Esses sistemas incluem os operons *ars*, grupos de genes amplamente distribuídos em espécies bacterianas, que podem ser encontrados em plasmídeos bacterianos ou em cromossomos de microrganismos. Esses genes podem estar organizados tanto na forma de *arsRDABC* quanto na forma de *arsRBC* (Tsai et al., 2009).

A proteína ArsA é uma ATPase que interage com ArsB para formar uma bomba de efluxo de arsenito, responsáveis por expulsar a maior quantidade possível do composto de dentro da célula. Esse mecanismo é codificado a partir da hidrólise de ATP pelos genes *arsA\_I* e *arsA\_II*, que se diferenciam pelo tamanho do fragmento (Yang et al., 2012). ArsB é uma proteína de membrana integral capaz de extrair arsenito do citoplasma da célula, diminuindo assim a acumulação de arsenito (Yang et al., 2012).

A regulação do operon é realizada por proteínas reguladoras, como os genes *arsR* e *arsD*, em que o gene *arsR* atua como um repressor, enquanto o gene *arsD* age como um regulador secundário da transcrição (Bruins et al., 2000). Isto é, quando não há arsênio disponível, as proteínas atuam como repressoras transcricionais que se unem a região promotora do operon inibindo a sua transcrição (Xu et al., 1998).

### 2.9.2 Mecanismo de resistência ao Cobre (Cu) em enterococos

Mecanismos de regulação da concentração intracelular do cobre em microrganismos vêm sendo estudados há um tempo, Hasman (2002) e Brown (1995) foram pioneiros no relato da resistência adquirida ao cobre tanto em bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas. A homeostase do cobre é mediada pela expressão de proteínas chaperonas de cobre, como proteínas transportadoras de  $\text{Cu}^{2+}$ , ATPases transportadoras de  $\text{Cu}^{2+}$  e uma chaperona de Cu-Zn superóxido dismutase, que ajudam na regulação da captação, transporte intracelular e exportação de Cu (Engle et al., 2011).

Um grupo de proteínas que atravessam a membrana, chamadas CPxATPases, codificadas pelo operon de quatro genes *copYZAB*, regulam a homeostase do cobre em bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus hirae* (Magnani et al., 2005). O operon *cop* consiste em quatro genes (*copYZAB*) controlados pelo mesmo promotor. O gene *copA* é responsável por codificar

uma ATPase de captação de  $\text{Cu}^{2+}$  e *copB* codifica uma ATPase de bomba de efluxo. Os produtos dos genes *copY* e *copZ* regulam o operon *cop* (Silver & Phung, 1996).

Outro gene de resistência ao cobre é o *tcrB*, relatado pela primeira vez na Dinamarca (Hasman et al., 2002; Hasman et al., 2006) em *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii*. O gene *tcrB* é frequentemente encontrado em um plasmídeo, que também carrega os genes *erm(B)* e *vanA*, que codificam a resistência a macrolídeos e glicopeptídeos, respectivamente (Hasman et al., 2002; Hasman et al., 2006). O operon *tcrYAZB* é adquirido no plasmídeo, sendo comumente encontrado em proximidade a um conjunto de genes *cueO*, que codificam uma enzima multicopper oxidase que presumidamente tem papel na conversão de  $\text{Cu}^+$  para  $\text{Cu}^{2+}$  durante condições aeróbicas, visando desintoxicação (Ladomersky & Petris, 2015). O gene *tcrB* (gene de resistência transferível ao cobre B) é um dos constituintes do operon e codifica uma bomba de efluxo do subgrupo P1B-3-ATPase que é ativada por  $\text{Cu}^{2+}$ , e em menor medida,  $\text{Cu}^+$  (Arguello, 2003).

Diferente do arsênio, o cobre em concentrações baixas é essencial para diversos processos celulares das bactérias, porém, em concentrações elevadas, ele pode se tornar tóxico para as células. O que representa que, a presença dos genes que conferem resistência a esse metal, são apenas desenvolvidos em situações de altas taxas de exposição, estimulando mecanismos de adaptação à sobrevivência (Nies, 2004).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta amostral

As amostras foram coletadas pelo projeto Felinos do Pampa, que realizou campanhas de captura de 10 a 15 dias de duração, entre junho de 2022 a fevereiro de 2023. Para a captura, foram utilizadas armadilhas “modelo Tomahawk” com isca viva (galinhas ou pombas-domésticas), as quais eram mantidas com água, comida e conforto térmico adequado à sua sobrevivência. Os felinos eram atraídos pelo estímulo visual, sonoro e olfativo, visto que não conseguiam ter contato físico com as aves (Tirelli et al. 2018; Tortato, 2019).

Dentre os felinos selvagens coletados, foram utilizadas amostras de 14 animais diferentes, todos de gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*), 11 suabes orais (Figura 4) e 12 suabes retais (Tabela 1). As amostras utilizadas no estudo foram coletadas na região do estado do Rio Grande do Sul, em Seival, distrito pertencente ao município de Candiota. As amostras foram coletadas e armazenadas em meio de cultivo para transporte por pesquisadores do projeto Felinos do Pampa. Posterior a isso, elas foram adequadamente identificadas e transferidas até o Laboratório de Microbiologia de Animais Silvestres, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foram mantidas sob refrigeração de 4°C até a realização das análises microbiológicas.

As capturas de *L. geoffroyi* em 2022 foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade segundo a anuência ICMBIO/SISBIO-81869-2, com vínculo restrito ao âmbito acadêmico. Por fim, os métodos aqui aplicados também foram discutidos perante a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo autorizadas junto ao escopo do projeto CEUA/UFRGS-42867.

**Tabela 1 - Descrição das amostras coletadas de gatos-do-mato-grande**

| Número  | Espécie             | Sexo | Peso (g) | Município | Estado | Data     |
|---------|---------------------|------|----------|-----------|--------|----------|
| CAN64   | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 4400     | Candiota  | RS     | 22/08/22 |
| CAN111  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 4800     | Candiota  | RS     | 05/06/22 |
| CAN112  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 2350     | Candiota  | RS     | 05/06/22 |
| CAN 113 | <i>L. geoffroyi</i> | M    | 3400     | Candiota  | RS     | 05/06/22 |
| CAN114  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 3800     | Candiota  | RS     | 09/06/22 |
| CAN117  | <i>L.geoffroyi</i>  | F    | 2850     | Candiota  | RS     | 22/08/22 |
| CAN118  | <i>L.geoffroyi</i>  | F    | 3100     | Candiota  | RS     | 23/08/22 |
| CAN119  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 3700     | Candiota  | RS     | 24/08/22 |
| CAN120  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 2250     | Candiota  | RS     | 24/08/22 |
| CAN121  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 5500     | Candiota  | RS     | 24/08/22 |
| CAN122  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 6100     | Candiota  | RS     | 26/08/22 |
| CAN123  | <i>L.geoffroyi</i>  | F    | 3350     | Candiota  | RS     | 27/08/22 |
| CAN124  | <i>L.geoffroyi</i>  | F    | 1750     | Candiota  | RS     | 27/08/22 |
| CAN126  | <i>L.geoffroyi</i>  | M    | 3250     | Candiota  | RS     | 28/08/22 |

Fonte: Felipe Peters

## 3.2 Área de estudo

### 3.2.1 Pampa brasileiro – município de Candiota

O município de Candiota está situado na metade sul do estado do Rio Grande do Sul, estando a 387 km da capital, Porto Alegre. Possui densidade demográfica de 11,47hab./km<sup>2</sup>, com 10.710 habitantes e área total de 933,628 km<sup>2</sup> (IBGE, 2022), onde 73.234,754 hectares são destinados a atividades agropecuárias, o que representa 78,4% de sua área total. A pecuária local se destaca pela criação de gado leiteiro e ovinocultura, enquanto a agricultura é impulsionada pela produção de sementes oleícolas e agroecológicas, com crescente desenvolvimento no cultivo de soja e forte produção de arroz e uva. Devido à riqueza de seu subsolo em carvão e calcário, a principal atividade econômica do município é a geração de energia termelétrica, com o objetivo de se tornar uma potência energética nacional. Atualmente, três grandes empresas termoelétricas mineradoras de carvão mineral operam na cidade, além de uma fábrica de cimento pertencente a um dos maiores grupos do mercado global.

Figura 4 - Localização do distrito de Candiota no estado do Rio Grande do Sul onde os animais foram capturados



Fonte: IBGE, 2022

### 3. 3 Isolamento das bactérias do gênero *Enterococcus*

Para a seleção das bactérias do gênero *Enterococcus*, primeiramente, os suabes orais (identificados como CB e retais como CA) foram mergulhados em tubos contendo 3mL de Caldo Azida Dextrose (*Azida Dextrose Broth*, *Himedia*®, Índia), meio seletivo para enterococos e estreptococos, e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Na sequência, foi realizada a diluição seriada, a qual foi feita 6 vezes, com tubos de 9ml de solução salina a 0,85% de NaCl, utilizando sempre 1ml do tubo anterior a partir do tubo inicial de Caldo Azida Dextrose. Após esse processo, 100µL das últimas duas diluições foram plaqueadas pelo método de espalhamento em superfície (*Spread Plate*) em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI, *Brain Heart Infusion*) com concentração de 4,5% de NaCl e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação foram selecionadas, aleatoriamente, 6 unidades formadoras de colônia (UFC), repicadas pelo método de esgotamento em ágar Bile Esculina e incubadas a 37°C por 24 horas. Com o objetivo de diferenciar a presença de estreptococos do grupo D e enterococos, avalia-se o escurecimento das amostras, devido a capacidade de enterococos de hidrolisar a esculina, formando esculetina e dextrose (Meyer et al., 1926). Após o escurecimento das amostras, indicando presença de enterococos, essas amostras foram repicadas em ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 horas para provas posteriores.

As culturas selecionadas foram submetidas aos testes de caracterização fenotípica morfofisiológica para identificação do gênero dessas bactérias, como teste da catalase e coloração de Gram. No teste da catalase foi possível verificar a ação da enzima da catalase produzida pelo microrganismo, sendo a ausência de formação de bolhas - resultantes da hidrólise do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela enzima - indicativo de reação característica de enterococos. Esfregaços foram preparados para a técnica de coloração de Gram. Sendo analisados no microscópio óptico, com o objetivo de identificar se as bactérias isoladas são cocos gram-positivos, isolados, aos pares ou em cadeia curtas - característicos do gênero *Enterococcus* sp. Em seguida a identificação presuntiva do gênero, os isolados caracterizados como enterococos foram armazenados em criotubos contendo 1mL de solução de meio para preservação contendo 10% de leite desnatado e 10% de glicerol (Cody et al., 2008) a -20°C, para posterior análise molecular a respeito da espécie.

### **3. 4 Identificação das espécies de *Enterococcus***

Para identificação de espécies, a técnica de ionização e desorção a laser assistida por matriz (MALDI - TOF) foi utilizada nos isolados de enterococos, segundo Sauget et al. (2017). A análise no MALDI-TOF foi realizada utilizando um microflex LT Bruker espectrômetro de massa (Bruker Daltonik GmbH) e os espectros identificados utilizando o programa BrukerBioTyper.

Para diferenciação de *E. faecium* e *E. casseliflavus*, espécies que exibem resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina, foram realizados dois testes bioquímicos conforme relatado por Cartwright et al. (1995). O primeiro foi o teste da produção de pigmento, a partir do crescimento das amostras de *E. faecium* em placas com BHI, e da utilização de um cotonete estéril para avaliar a produção do pigmento amarelo, indicativo da espécie *E. casseliflavus*. Além disso, foi realizado o teste da motilidade, por meio da introdução de agulha com colônia bacteriana, em coluna reta até a profundidade de 2/3 em meio de cultura semissólido de ágar BHI e posterior incubação por 24h a 37°C. Nesse teste, *E. casseliflavus* apresenta resultado positivo e *E. faecium* negativo, o que permite classificar corretamente cada espécie.

### **3. 5 Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

Os enterococos isolados foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através do teste de disco-difusão em meio ágar Mueller Hinton, segundo o

método de Kirby-Bauer (1966). Um inóculo de cada amostra bacteriana foi diluído em 5ml de solução salina na concentração de 0,85% de NaCl 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 Muller Hinton (Muller Hinton Agar, Acumedia®, Neogen, Michigan) com o auxílio de suabe.

Uma vez inoculadas e adicionados os antimicrobianos, as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. O diâmetro dos halos de inibição de crescimento foi medido e as amostras foram classificadas como sensível (S), sensibilidade intermediária (I) e resistente (R), através das faixas de interpretação previamente estabelecidas para *Enterococcus* sp. (CLSI, 2018). Os isolados foram testados para os seguintes antimicrobianos: Ampicilina (10 µg), Vancomicina (30 µg), Rifampicina (5 µg), Tetraciclina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Norfloxacina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Linezolida (10 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina e Estreptomicina seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2021)

### **3. 6 Determinação do perfil de suscetibilidade a metais pesados**

A análise fenotípica da tolerância ao arsênio foi inferida pelo método de mínima concentração inibitória (MIC), descrito por Pasquaroli et al. (2014) e Rebelo et al. (2021). Para esta determinação foi utilizada diluição de ágar Mueller Hinton suplementado com arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em placas nas concentrações 8–16 mM. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle positivo para tolerância ao arsênio utilizamos a cepa *Listeria monocytogenes* ALD11249.1 e para o controle negativo a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Rebelo et al. 2021).

### **3. 7 Extração do DNA genômico e detecção dos genes relacionados à resistência aos antimicrobianos e aos metais pesados**

Para análise da presença dos genes relacionados à resistência aos antibióticos e metais pesados, foi extraído o DNA dos isolados de enterococos por lise química conforme Donato (2007). O DNA resultante foi congelado a -20°C e utilizado para detecção dos genes de interesse em todas as reações em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase chain reaction*) subsequentes. As reações de PCR foram realizadas seguindo os parâmetros anteriormente definidos apresentados na tabela 2.



A análise dos genes de resistência aos antibióticos foi realizada em todas as amostras que apresentaram fenótipo resistente à eritromicina e a tetraciclina. Nessas cepas foi realizada a PCR para a detecção dos genes de resistência a eritromicina *ermB* e *msrC* e os genes de resistência a tetraciclina *tetL* e *tetM*. As cepas 485 (Medeiros, 2011) e CM5-2 (Oliveira de Araújo, 2019) foram utilizadas como controle positivo para *ermB* e *msrC*, respectivamente. Para o controle positivo dos genes *tetL* e *tetM* da tetraciclina foram usadas as cepas CM11-3 e CM5-6 (Oliveira de Araújo, 2019).

Já para a análise da presença dos genes associados aos metais pesados, todas as cepas isoladas foram testadas para os genes *arsA\_I* e *arsA\_II* que conferem resistência ao arsênio, assim como para o gene *tcrB*, que confere resistência ao cobre. Como controle positivo foi utilizada a cepa *E. faecalis* ATCC 29212 para *arsA\_I* e *tcrB*, e a cepa *L. monocytogenes* ALD11249.1 para o gene *arsA\_II*. (Rebelo et al., 2021).

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR, foram aplicados 8 µL de cada amostra em um gel de agarose em concentração de 1,0 %, dissolvido em tampão tris-borato-EDTA 1x (TBE) e corado com tampão de reação com Gel Red (QuatroG). O gel foi submetido a uma tensão de 50 volts e 80 mA por 80 minutos para migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

**Tabela 2 - Parâmetros adotados para detectar genes de resistência aos metais pesados arsênio e cobre e aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina em *Enterococcus sp.* por reação em cadeia da polimerase**

| Nome do Primer      | Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5'-3') | Tamanho do fragmento (pb) | Temperatura de anelamento | Referência             |
|---------------------|---|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| <b>Arsênio</b>      |   |                           |                           |                        |
| <i>arsA_I_F</i>     | GGC AAT YGC CGC AGC AAT                         | 643                       | 58°C                      | Rebelo et al., 2021    |
| <i>arsA_I_R</i>     | TGA TCC AGA AGC AGA GAA GT                      |                           |                           |                        |
| <i>arsA_II_F</i>    | GTA GAA GGT TTA GTT GTC GCC A                   | 728                       | 62°C                      | Rebelo et al., 2021    |
| <i>arsA_II_R</i>    | TGT AAG TGR GGA AAT TCT TTT GGT                 |                           |                           |                        |
| <b>Cobre</b>        |   |                           |                           |                        |
| <i>tcrB_F</i>       | CAT CAC GGT AGC TTT AAG GAG ATT<br>TTC          | 663                       | 56°C                      | Hasman et al., 2006    |
| <i>tcrB_R</i>       | ATA GAG GAC TCC GCC ACC ATT G                   |                           |                           |                        |
| <b>Eritromicina</b> |   |                           |                           |                        |
| <i>ermB_F</i>       | GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA                     | 574                       | 52°C                      | Sutcliffe et al., 1996 |
| <i>ermB_R</i>       | AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC                 |                           |                           |                        |
| <i>msrC_F</i>       | AAG GAA TCC TTC TCT CTC CG                      | 343                       | 52°C                      | Werner et al., 2001    |
| <i>msrC_R</i>       | GTA AAC AAA ATC GTT CCC G                       |                           |                           |                        |
| <b>Tetraciclina</b> |   |                           |                           |                        |
| <i>tet(L)_F</i>     | ACT CGT AAT GGT GTA GTT GC                      | 625                       | 58°C                      | Frazzon et al., 2010   |
| <i>tet(L)_R</i>     | TGT AAC TCC GAT GTT TAA CACG                    |                           |                           |                        |
| <i>tet(M)_F</i>     | GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG                      | 657                       | 52°C                      | Aerestrup et al., 2000 |
| <i>tet(M)_R</i>     | CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA                      |                           |                           |                        |

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Enterococcus* sp. em amostras orais e fecais de gatos-do-mato-grande da região de Candiota-Bioma Pampa

No presente estudo foram isolados um total 141 cepas de *Enterococcus* sp. de 23 amostras orais e retais de 14 animais diferentes, onde de cada amostra foram selecionadas em média 6 colônias. Dos 141 enterococos isolados, 69 foram isolados de suabes orais e 72 isolados de suabes retais, as quais foram identificadas como CB (amostras orais) e CA (amostras retais). As amostras CB 64, CB 113, CB 121, CB 123 e CA 124 não apresentaram crescimento de enterococos.

Entre as espécies identificadas *E. faecalis* (36,8%; n=52) e *E. faecium* (28,3%; n=40) foram as mais frequentes, seguidas de *E. hirae* (19,8%; n=28), *E. casseliflavus* (7,8%; n=11), *E. durans* (5,7%; n=8) e *E. mundtii* (1,4%; n=2). O resultado obtido consta na Tabela 3.

A espécie mais frequentemente identificada nos suabes orais foi *E. faecalis* (47,8%; n=33), seguida por *E. faecium* (27,5%; n=19), *E. casseliflavus* (8,7%; n=6), *E. durans* (8,7%; n=6) e, *E. hirae* (7,2; n=5). Já nos suabes do ânus, a espécie mais frequente foi *E. hirae* (31,9%; n=23), seguido por *E. faecium* (29%; n=21), *E. faecalis* (26,4%; n=19), *E. casseliflavus* (6,9%; n=5) e, com a mesma frequência (2,7%, n=2), *E. durans* e *E. mundtii*. Só foi possível identificar *E. mundtii* nas amostras retais da espécie.

**Tabela 3 – Resultado do isolamento de *Enterococcus* sp. de amostras do trato gastrointestinal e da boca de gatos-do-mato-grande.**

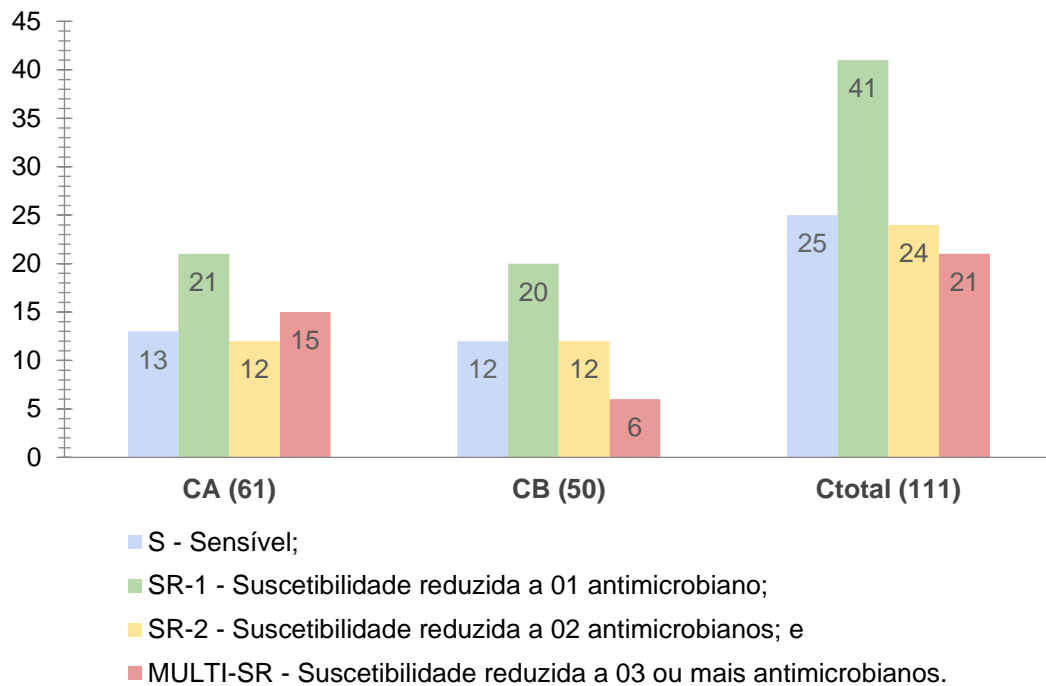
| Animal              | Amostra<br>(n de isolados) | Número de espécies (%)   | Número total<br>de isolados |
|---------------------|----------------------------|--|-----------------------------|
| Gato-do-mato-grande | CB (69)                    | 33 <i>E. faecalis</i> (47,8)<br>19 <i>E. faecium</i> (27,5)<br>6 <i>E. casseliflavus</i> (8,7)<br>6 <i>E. hirae</i> (8,7)<br>5 <i>E. durans</i> (7,2)                              | 141                         |
|                     | CA (72)                    | 23 <i>E. hirae</i> (31,9)<br>21 <i>E. faecium</i> (29)<br>19 <i>E. faecalis</i> (26,4)<br>5 <i>E. casseliflavus</i> (6,9)<br>2 <i>E. durans</i> (2,7)<br>2 <i>E. mundtii</i> (2,7) |                             |

Fonte: o próprio autor

#### 4.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de enterococos

Foram selecionadas 111 amostras aleatoriamente para realizar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana, dentre as 111 amostras, 61 eram provenientes de suabe retal e 50 de suabe oral. O perfil de suscetibilidade está na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada para a totalidade de cepas isoladas das amostras de gatos-do-mato-grande



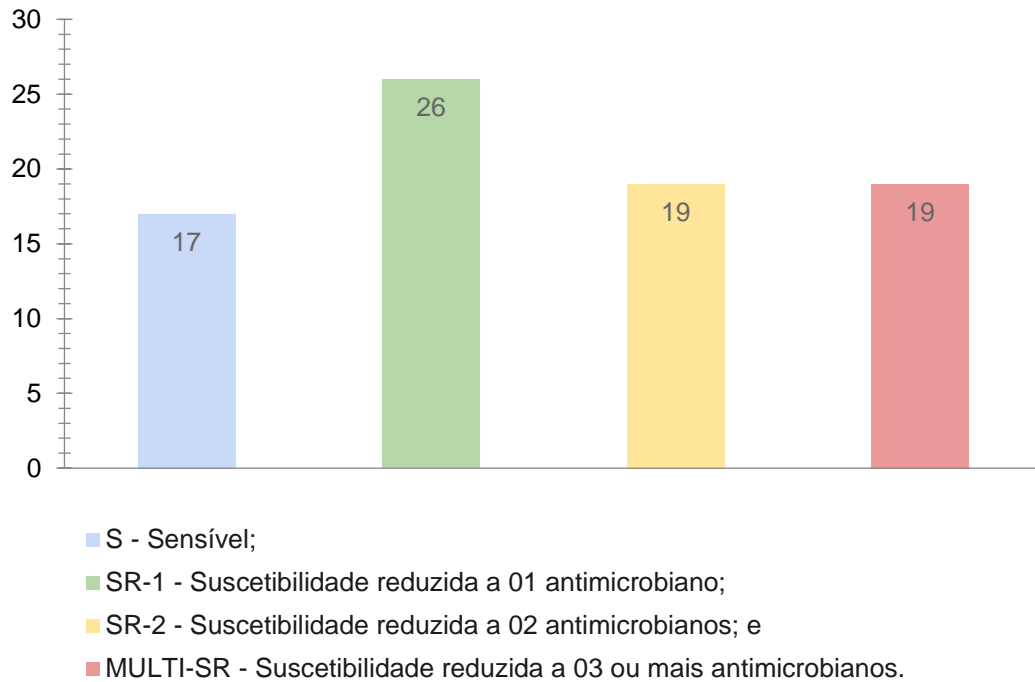
\*CA (amostras de suabes do ânus); CB (amostras de suabes orais)

Fonte: o próprio autor

Após a análise do perfil de susceptibilidade das 111 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 clonalidade 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 81 cepas.

Das 81 cepas, 64 (79,01%) apresentaram suscetibilidade reduzida a um ou mais antimicrobianos, ou seja, 17 (21%) das cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos usados. As cepas que apresentaram suscetibilidade reduzida, 26 (40,62%) apresentaram suscetibilidade reduzida a uma classe (SR-1), 19 (29,7%) a duas classes (SR-2) e 19 (29,7%) a mais de duas classes, sendo considerados multirresistentes (MULTI-SR) (Figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das 81 amostras coletadas de gatos-do-mato-grande



Fonte: o próprio autor

A porcentagem de suscetibilidade antimicrobiana reduzida detectada nos isolados de *Enterococcus* sp. encontrados em gatos-do-mato-grande pode ser visualizada na Tabela 4. As propriedades de suscetibilidade reduzida mais frequentemente encontradas foram para 44,4% (36/81) para rifampicina, 37% (30/81) para eritromicina, 30,9% (25/81) para ciprofloxacina, 22,2% (18/81) para tetraciclina, 14,8% (12/81) para norfloxacin, 12,3% (10/81) para vancomicina, 7,4% (6/81) para nitrofurantoína, 3,7% (3/81) para estreptomicina, 2,5% (2/81) para linezolida e 1,2% (1/81) tanto para ampicilina, quanto para o cloranfenicol. Nenhuma das cepas apresentou redução da sua suscetibilidade frente a gentamicina.

**Tabela 4 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes de gatos-do-mato-grande**

| Antimicrobiano         | Número de espécies (%) com suscetibilidade reduzida |                              |                                  |                          |                           |                            | Total<br>n (%)*  |
|------------------------|---|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------|
|                        | <i>E. faecium</i><br>(n=34)                         | <i>E. faecalis</i><br>(n=24) | <i>E. casseliflavus</i><br>(n=9) | <i>E. hirae</i><br>(n=8) | <i>E. durans</i><br>(n=5) | <i>E. mundtii</i><br>(n=1) |                  |
| <b>Ampicilina</b>      | 1 (2,9)   | 0                            | 0                                | 0                        | 0                         | 0                          | <b>1 (1,2)</b>   |
| <b>Ciprofloxacina</b>  | 20 (58,8)   | 1 (4,17)                     | 1 (11,1)                         | 2 (25)                   | 1 (20)                    | 0                          | <b>25 (30,9)</b> |
| <b>Cloranfenicol</b>   | 1 (2,9)   | 0                            | 0                                | 0                        | 0                         | 0                          | <b>1 (1,2)</b>   |
| <b>Eritromicina</b>    | 16 (47)   | 7 (29,2)                     | 4 (44,4)                         | 2 (25)                   | 0                         | 1 (100)                    | <b>30 (37)</b>   |
| <b>Estreptomicina</b>  | 3 (8,8)   | 0                            | 0                                | 0                        | 0                         | 0                          | <b>3 (3,7)</b>   |
| <b>Linezolida</b>      | 1 (2,9)   | 1 (4,2)                      | 0                                | 0                        | 0                         | 0                          | <b>2 (2,5)</b>   |
| <b>Nitrofurantoína</b> | 5 (14,7)  | 0                            | 0                                | 1 (12,5)                 | 0                         | 0                          | <b>6 (7,4)</b>   |
| <b>Norfloxacina</b>    | 11 (32,3)   | 0                            | 0                                | 1 (12,5)                 | 0                         | 0                          | <b>12 (14,8)</b> |
| <b>Rifampicina</b>     | 19 (55,9)   | 10 (41,7)                    | 4 (44,4)                         | 1 (12,5)                 | 2 (40)                    | 0                          | <b>36 (44,4)</b> |
| <b>Tetraciclina</b>    | 14 (41,2)   | 1 (4,2)                      | 2 (22,2)                         | 0                        | 1 (20)                    | 0                          | <b>18 (22,2)</b> |
| <b>Vancomicina</b>     | 0   | 1 (4,2)**                    | 0***                             | 0                        | 0                         | 0                          | <b>1 (1,2)</b>   |

\* % calculado sobre as 81 cepas avaliadas.

\*\* A confirmação da resistência é feita pela técnica de concentração inibitória.

\*\*\* *E. casseliflavus* possui suscetibilidade reduzida intrínseca.

Fonte: o próprio autor

Dentre as espécies estudadas, observou-se que quase todas as espécies apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina e a rifampicina, com exceção do *E. mundtii*, que conseguimos analisar a sua suscetibilidade em apenas uma cepa. A espécie mais frequentemente observada e com maior incidência de suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos foi *E. faecium*, isoladas tanto de suabes retais, quanto orais. Com um total de 34 cepas da espécie, o antibiótico com maior sensibilidade reduzida foi a ciprofloxacina, com uma frequência de 58,8% (20/34), seguido pela rifampicina com 55,9% (19/34), eritromicina 47% (16/34), tetraciclina 41,2% (14/34), norfloxacina 32,3% (11/34), nitrofurantoína 14,7% (5/34), estreptomicina 8,8% (3/34) e 2,9% (1/3) para linezolida, cloranfenicol e ampicilina. A vancomicina não apresentou sensibilidade reduzida nessa espécie.

Outra espécie que apresentou maior frequência de cepas com sensibilidade reduzida aos antimicrobianos foi *E. faecalis*, com 41,7% (10/24) apresentando suscetibilidade reduzida para rifampicina e 29% (7/24) para eritromicina. Os antibióticos ciprofloxacina, linezolida, e tetraciclina obtiveram a mesma suscetibilidade, de 4,2% (1/24). Nenhuma cepa de *E. faecalis*

apresentou susceptibilidade para cloranfenicol, ampicilina, estreptomicina, nitrofurantoína e norfloxacina.

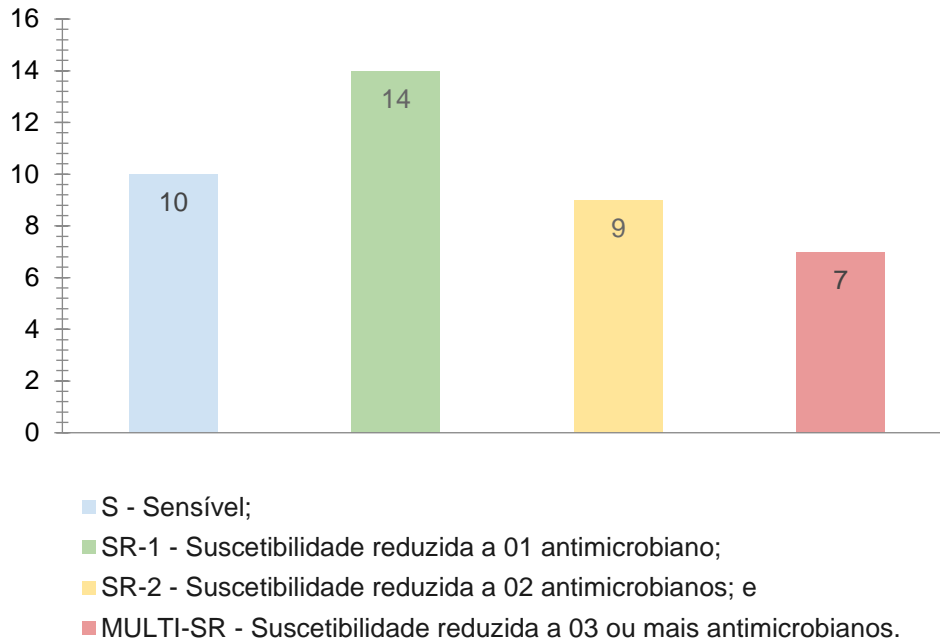
Devido a sua suscetibilidade intrínseca à vancomicina, todas as cepas de *E. casseliflavus* apresentaram sensibilidade reduzida ao antibiótico. Além disso, 44,4% (4/9) das cepas foram resistentes para eritromicina e rifampicina, 22,2% (2/9) para a tetraciclina e 11% (1/9) para a ciprofloxacina. Entre os 8 *E. hirae* provenientes das amostras analisadas, os antimicrobianos ciprofloxacina e eritromicina foram os que apresentaram maior frequência na redução da sua sensibilidade, com um percentual de 25% (2/8), seguidos de 12,5% (1/8) da rifampicina, norfloxacina e nitrofurantoína. Além disso, 5 amostras da espécie *E. durans* também apresentaram redução da sua sensibilidade frente a alguns antimicrobianos, com maior frequência a rifampicina 40% (2/5), seguido de 20% (1/5) da tetraciclina e ciprofloxacina. Por fim, a única amostra de *E. mundtii*, apresentou sensibilidade apenas à eritromicina.

#### 4.2.1. Perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* spp. obtidos de amostras da boca de gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)

As cepas de enterococos isoladas a partir dos de suabes orais dos animais apresentaram diferentes perfis de suscetibilidade entre os animais. Das 40 cepas provenientes da boca, 10 (25%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 14 (35%) apresentaram susceptibilidade reduzida a uma classe (SR-1), nove (22,5%) a duas classes (SR-2) e sete (17,5%) a mais de duas classes, classificados como multirresistentes (MULTI-SR) (Figura 7).



Figura 7 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das amostras coletadas da boca de gatos-do-mato-grande



Fonte: o próprio autor

A suscetibilidade reduzida em cada grupo de antibiótico nos isolados de *Enterococcus* sp. das amostras de bocas estão representados na tabela 5. Assim como nas amostras totais, os isolados apresentaram com maior frequência redução da suscetibilidade à rifampicina (18/40), em 45% das amostras. A porcentagem de redução foi também significativa em 30% das amostras testadas para a eritromicina (12/40), seguido de 20% à ciprofloxacina (8/40), 12,5% à tetraciclina (5/40), 7,5% a norfloxacina (3/40) e uma frequência de 2,5% para linezolida e nitrofurantoína (1/40). Nenhuma das cepas apresentaram suscetibilidade reduzida frente aos testes com estreptomicina, cloranfenicol, ampicilina e gentamicina.

**Tabela 5 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes da boca de gatos-do-mato-grande**

| Antimicrobiano         | Número de espécies (%) com suscetibilidade reduzida |                              |                                  |                           | Total<br>n (%)* |
|------------------------|---|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------|
|                        | <i>E. faecium</i><br>(n=15)                         | <i>E. faecalis</i><br>(n=15) | <i>E. casseliflavus</i><br>(n=5) | <i>E. durans</i><br>(n=5) |                 |
| <b>Ciprofloxacina</b>  | 7 (46,67)   | 0                            | 0                                | 1 (20)                    | <b>8 (20)</b>   |
| <b>Eritromicina</b>    | 5 (33,33)   | 4 (26,67)                    | 3 (60)                           | 0                         | <b>12 (30)</b>  |
| <b>Linezolida</b>      | 0   | 1 (6,67)                     | 0                                | 0                         | <b>1 (2,5)</b>  |
| <b>Nitrofurantoína</b> | 1 (6,67)  | 0                            | 0                                | 0                         | <b>1 (2,5)</b>  |
| <b>Norfloxacino</b>    | 5 (33,33)   | 0                            | 0                                | 0                         | <b>5 (12,5)</b> |
| <b>Rifampicina</b>     | 9 (60)  | 4 (26,67)                    | 3 (60)                           | 2 (40)                    | <b>18 (45)</b>  |
| <b>Tetraciclina</b>    | 3 (20)  | 1 (6,67)                     | 0                                | 1 (20)                    | <b>5 (12,5)</b> |
| <b>Vancomicina</b>     | 0   | 1 (6,67)**                   | 0***                             | 0                         | <b>1 (2,5)</b>  |

\* % calculado sobre as 40 cepas avaliadas.

\*\* A confirmação da resistência e feita pela técnica de concentração inibitória.

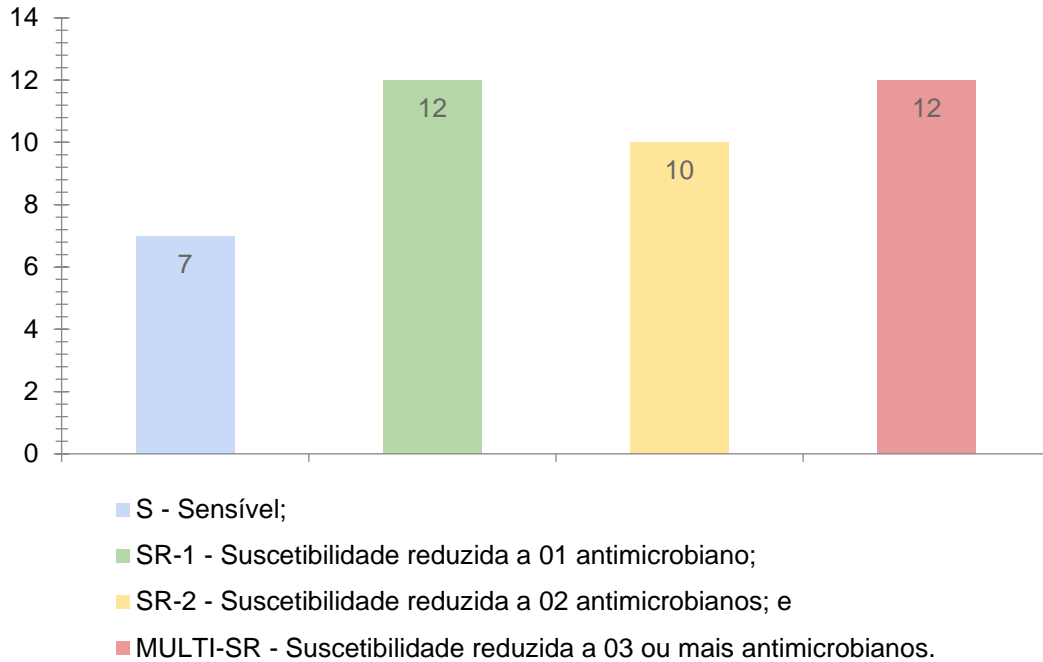
\*\*\* *E. casseliflavus* possui suscetibilidade reduzida intrínseca.

Fonte: o próprio autor

#### 4.2.2 Perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus spp.* obtidos de amostras do ânus de gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)

Foram analisadas 41 amostras provenientes de suabes retais dos animais, em que 82,9% (n=34), apresentaram suscetibilidade reduzida a um ou mais antimicrobianos testados. Isto é, como demonstrado na figura 8, verificou-se que 29,3% (n=12) das amostras possuíam sensibilidade reduzida a uma classe (SR-1), 24,4% (n=10) a duas classes (SR-2) e, 29,3% (n=12), a mais de duas classes, ou seja, amostras multirresistentes (MULTI-SR). O restante das amostras, 17,07% (n=7), não obtiveram alterações nos testes de sensibilidade.

Figura 8 – Representação gráfica do perfil de suscetibilidade antimicrobiana reduzida observada das amostras coletadas do ânus de gatos-do-mato-grande



Fonte: o próprio autor

A porcentagem de suscetibilidade antimicrobiana reduzida detectada nos isolados de *Enterococcus sp.* do ânus de gatos-do-mato-grande pode ser visualizada na Tabela 6. As propriedades de suscetibilidade reduzida mais frequentemente encontradas foram igualmente 44% (18/41) para rifampicina e eritromicina, seguido por 71,5% para ciprofloxacina (17/40), 31,7% para tetraciclina (13/41), 17% para norfloxacino (7/41), 12,2% para nitrofurantoína (5/41), 7,3% para estreptomina (3/41) e a mesma frequência de 2,43% para cloranfenicol, linezolida e ampicilina (1/41). Nenhuma das cepas apresentou redução da sua suscetibilidade frente a gentamicina e a vancomicina.

**Tabela 6 - Resultado do teste de suscetibilidade reduzida (resistência) encontrada em isolados provenientes do ânus de gatos-do-mato-grande**

| Antimicrobiano         | Número de espécies (%) com suscetibilidade reduzida |                             |                                  |                          |                            | Total<br>n (%)*  |
|------------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|
|                        | <i>E. faecium</i><br>(n=19)                         | <i>E. faecalis</i><br>(n=9) | <i>E. casseliflavus</i><br>(n=4) | <i>E. hirae</i><br>(n=8) | <i>E. mundtii</i><br>(n=1) |                  |
| <b>Ciprofloxacina</b>  | 13 (68,4)   | 1 (11,1)                    | 1 (25)                           | 2 (25)                   | 0                          | <b>17 (41,5)</b> |
| <b>Eritromicina</b>    | 11 (57,9)   | 3 (33,33)                   | 1 (25)                           | 2 (25)                   | 1 (100)                    | <b>18 (44)</b>   |
| <b>Estreptomicina</b>  | 3 (15,8)  | 0                           | 0                                | 0                        | 0                          | <b>3 (7,3)</b>   |
| <b>Cloranfenicol</b>   | 1 (5,26)  | 0                           | 0                                | 0                        | 0                          | <b>1 (2,43)</b>  |
| <b>Linezolida</b>      | 1 (5,26)  | 0                           | 0                                | 0                        | 0                          | <b>1 (2,43)</b>  |
| <b>Ampicilina</b>      | 1 (5,26)  | 0                           | 0                                | 0                        | 0                          | <b>1 (2,43)</b>  |
| <b>Nitrofurantoína</b> | 4 (21)  | 0                           | 0                                | 1 (12,5)                 | 0                          | <b>5 (12,2)</b>  |
| <b>Norfloxacino</b>    | 6 (31,6)  | 0                           | 0                                | 1 (12,5)                 | 0                          | <b>7 (17)</b>    |
| <b>Rifampicina</b>     | 10 (52,6)   | 5 (55,56)                   | 2 (50)                           | 1 (12,5)                 | 0                          | <b>18 (44)</b>   |
| <b>Tetraciclina</b>    | 11 (57,9)   | 0                           | 2 (50)                           | 0                        | 0                          | <b>13 (31,7)</b> |

\* % calculado sobre as 41 cepas avaliadas.

Fonte: o próprio autor

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

Todos os 30 *Enterococcus sp.* que apresentaram suscetibilidade reduzida para eritromicina e os 18 com suscetibilidade reduzida a tetraciclina foram submetidos à PCR convencional a fim 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* e *tetM* (para redução de sensibilidade à tetraciclina).

Foi possível observar que das cepas com sensibilidade reduzida a eritromicina, 13 enterococos (43,3%) apresentaram resultado positivo para a presença do gene *msrC* e 1 (3,3%) para o gene *ermB*. Dentre os 13 enterococos positivos para *msrC*, 12 (92,3%) eram da espécie *E. faecium* e 1 (7,6%) era da espécie *E. durans*. A única cepa positiva para o gene *ermB* era da espécie *E. faecium*, a qual foi positiva para ambos os genes. Ademais, 1 enterococo apresentou resultado positivo para ambos os genes (Tabela 7). Dezesete enterococos (56,6%) com suscetibilidade reduzida para eritromicina não apresentaram amplificação para nenhum dos genes testados.

Quanto aos genes *tetL* e *tetM* relativos às 18 cepas que apresentaram redução de sensibilidade à tetraciclina, foi possível observar que para o gene *tetL*, 9 (50%) cepas foram positivas para o gene, sendo mais da metade (55,5%; n=5) da espécie *E. faecium*, (33,3%; n=3) *E. durans* e, (11,1%; n=1) *E. casseliflavus*. Já para o gene *tetM*, 13 (72,2%) cepas possuíram resultado positivo para o gene, com 69,2% (n=9) de frequência em *E. faecium*, 15,4% (n=2) em *E. durans* e 7,7% (n=1) em *E. faecalis* e *E. casseliflavus*.

**Tabela 7 – Resultado da presença de genes que conferem redução na suscetibilidade bacteriana à tetraciclina e à eritromicina em amostras de gatos-do-mato-grande**

| Gene         | Nº de espécies   | Total de isolados positivos (%) |
|--------------|--|---------------------------------|
|              | <b>positivas para o gene</b>   |                                 |
| <i>erm B</i> | 1 <i>E. faecium</i>  | 1 (3,3)                         |
| <i>msr C</i> | 12 <i>E. faecium</i><br>1 <i>E. durans</i>   | 13 (43,3)                       |
| <i>tet L</i> | 5 <i>E. faecium</i><br>3 <i>E. durans</i><br>1 <i>E. casseliflavus</i>                         | 9 (50)                          |
| <i>tet M</i> | 9 <i>E. faecium</i><br>2 <i>E. durans</i><br>1 <i>E. faecalis</i><br>1 <i>E. casseliflavus</i> | 13 (72,2)                       |

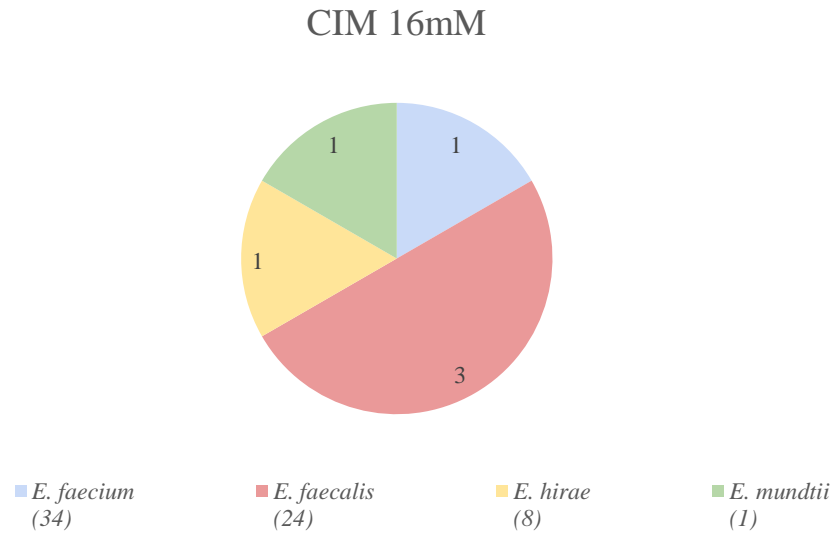
Fonte: o próprio autor

#### 4.4 Perfil de suscetibilidade aos metais pesados nas cepas de enterococos isoladas de *L. geoffroyi*

##### 4.4.1 Tolerância ao arsênio em cepas de enterococos pela técnica de concentração inibitória mínima em ágar

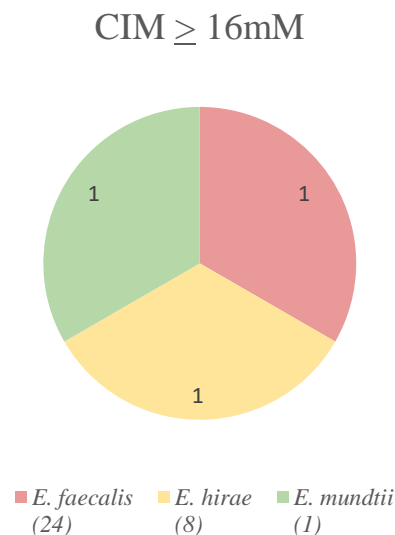
Foram realizados testes de concentração mínima inibitória (CIM) em duas concentrações diferentes de arsenato de sódio, 8mM e 16mM, em todas as 81 amostras. Seis cepas apresentaram crescimento em CIM de 16mM ao arsênio e três CIM  $\geq$  16mM, como está representado nas figuras 9 e 10 com as respectivas espécies de *Enterococcus*.

Figura 9 - Gráfico em pizza representando as cepas que apresentaram CIM de 16mM



No teste de concentração mínima inibitória (CIM) de 16mM, 7,4% das cepas apresentaram crescimento (6/81), em que, dentre as cepas positivas, a espécie *E. faecalis* foi a que apresentou maior frequência (3/6), seguido igualmente com a mesma frequência as espécies *E. mundtii*, *E. faecium* e *E. hirae*, com uma cepa positiva cada (1/6).

Figura 10 - Gráfico em pizza representando as cepas que apresentaram CIM  $\geq$  16mM



Já no teste de concentração mínima inibitória (CIM) para concentrações  $\geq$  16mM, apenas 3,7% das cepas apresentaram crescimento (3/81), com uma frequência igual de 1 cepa positiva nas três espécies, *E. mundtii*, *E. hirae* e *E. faecalis*.

#### **4.5 Detecção dos genes de resistência aos metais pesados nas cepas de enterococos isoladas**

##### 4.5.1 Detecção dos genes de resistência ao arsênio (*arsA\_I*, *arsA\_II*)

As seis cepas de enterococos tolerantes ao arsênio que foram avaliadas genotipicamente para a presença de *arsA\_II* não possuíram resultado positivo. O gene *arsA\_I* foi testado, mas apresentou resultados inconclusivos com a amplificação de bandas de tamanhos de fragmentos diferentes do gene em questão.

##### 4.5.2 Detecção do gene de resistência ao cobre (*tcrB*)

Todas as 81 cepas de enterococos que foram analisadas genotipicamente para o gene *tcrB*, que confere resistência ao cobre, apresentaram resultados negativos.

## 5. DISCUSSÃO:

Com a finalidade de discutir os impactos causados pelo homem na natureza e compreender as principais vias de contaminação por compostos tóxicos aos animais, os enterococos vem sendo utilizados como sentinelas ambientais. Devido a sua ampla distribuição na natureza e por sua resistência às condições adversas, como diferentes temperaturas (10-45°C), hiperosmolaridade (6,5 % NaCl) (Sherman, 1937), o gênero *Enterococcus* já foi muito utilizado em estudos, tanto com animais selvagens, quanto com domésticos, que avaliaram a aquisição de genes exógenos como fatores de interferência no ecossistema natural dos animais, como visto no trabalho de Rebelo e colaboradores (2021).

Para avaliar os impactos das atividades antropogênicas na fauna silvestre da região do bioma Pampa, foi possível isolar amostras de *Enterococcus* de suabes das fezes e das secreções orais provenientes de felinos da espécie gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) da região. O que nos permitiu avaliar alguns fatores, como a presença de genes que conferem resistência a antimicrobianos e a metais pesados, os quais podem ser indicativos dos impactos da poluição humana no habitat desses animais.

Como foi utilizado amostras provenientes de dois sítios diferentes do mesmo animal, da boca e do ânus, em algumas amostras, mesmo havendo crescimento bacteriano, não foi possível isolar enterococos de uma das fontes. Pode-se inferir alguns fatores sobre a não presença do gênero nessas amostras, desde a manipulação na coleta até, realmente, a menor frequência de enterococos na porção inicial do trato gastrointestinal, visto que dentre as cinco amostras que não apresentaram crescimento de *Enterococcus*, quatro eram oriundas da boca.

Em concordância com o que foi descrito por Oliveira de Araújo (2019) em um estudo que avaliou o gênero em isolados de fezes de animais silvestres, no atual estudo, as espécies de *Enterococcus* mais frequentemente identificadas também foram *E. faecalis* e *E. faecium*, com uma frequência de 36,8 e 28,3%. O estudo de Lebreton e colaboradores (2014), inferiu que a maior frequência dessas espécies ocorre provavelmente devido a sua maior abundância nas fezes humanas e por serem responsáveis pela maioria das doenças causadas por enterococos. Porém, essa frequência nem sempre foi assim, até meados da década de 1990, *E. faecalis* representava 90-95% dos isolados clínicos, e a infecção por *E. faecium* era rara. Desde então, a proporção de isolados de *E. faecium* aumentou, em grande parte devido à disseminação da resistência a antibióticos, especialmente à vancomicina e ampicilina.

Na análise da frequência das espécies de enterococos nas amostras de animais, a correlação com os hábitos alimentares é muito relevante, na medida em que a espécies



apresentam frequências diferentes em alguns ambientes e animais. Como os felinos selvagens possuem hábitos alimentares carnívoros, se alimentando de pequenos roedores e aves, algumas espécies de enterococos são mais presentes devido a isso. Espécies como *E. hirae* e *E. durans*, que apresentaram uma frequência de 19,8% e 5,7%, foram encontradas com maior prevalência em amostras de aves em alguns estudos, como o de Poeta e colaboradores (2005). Este fato permite relacionar a presença dessas espécies à dieta dos felinos selvagens que, por muitas vezes, inclui aves silvestres e o consumo de frangos de criação em fazendas. Além disso, a frequência alta das espécies *E. faecalis* e *E. hirae* também pode ser correlacionado com a alimentação desses animais. Conforme o estudo de Lauková e colaboradores (2008), que analisou amostras intestinais de roedores selvagens, 70% das amostras analisadas eram da espécie *E. faecalis*. Ou seja, o perfil de espécies de enterococos obtido neste estudo, permite inferir que a alimentação dos gatos-do-mato são importante fatores de influência para a colonização da sua microbiota intestinal.

Os testes para o perfil de suscetibilidade antimicrobiana foram feitos utilizando 12 antibióticos diferentes, onde quase 80% das cepas testadas apresentaram suscetibilidade reduzida a um ou mais tipos de antimicrobianos. A resistência aos antimicrobianos observada em animais selvagens é preocupante, especialmente considerando que esses animais não receberam antibióticos diretamente. Cepas com susceptibilidade reduzida foram observadas para os antibióticos rifampicina, eritromicina e ciprofloxacina, com uma frequência de 44,4%, 37% e 30,9%, respectivamente. Esses dados também foram observados no estudo de Oliveira de Araújo, (2019), em que amostras de gatos-do-mato-grande foram testadas para antibióticos semelhantes, e observou-se maior frequência de rifampicina, eritromicina e tetraciclina, estando apenas em discordância neste último, que apresentou uma frequência de 22,2%, ocupando a quarta posição neste estudo. As espécies de enterococos com maior incidência de suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos seguiram a logística das frequências nas amostras, em que *E. faecium* e *E. faecalis* foram as espécies mais frequentes.

Os resultados obtidos corroboram com a ideia de que o crescente uso de antibióticos pelo ser humano para diferentes finalidades impactam fortemente o ambiente. Tanto a utilização de antimicrobianos em ambientes hospitalares, quanto a utilização na agroindústria como objeto de promotor de crescimento, podem contaminar os solos e os efluentes. Como demonstrado no estudo de Xu e colaboradores (2014), genes de resistência a antibióticos e os próprios antibióticos foram verificados na água de diferentes etapas de estação de tratamento, o que demonstra o longo período para a degradação desses compostos e da pressão seletiva que eles podem causar nos microrganismos.

No Brasil, as tetraciclina foram proibidas como aditivos zootécnicos apenas em 2009 (Brasil, Instrução Normativa 26/2009), apesar de os antimicrobianos terem sido utilizados como promotores de crescimento desde meados da década de 1950 (Fernandez et al., 1973). Isso significa que o uso de antibióticos para essa finalidade permaneceu por quase 60 anos antes de ser proibido, resultando em um acúmulo significativo de resistências que ainda impactam a saúde até os dias atuais.

Foram analisados os genes que conferem resistência à tetraciclina e à eritromicina, antibióticos de amplo espectro utilizados tanto para tratamentos humanos, como na agroindústria. Dos dois genes testados nas amostras que apresentaram redução da sensibilidade à eritromicina, 43,3% das amostras possuíam resultado positivo para a presença do gene *msrC* e apenas uma amostra obteve resultado positivo para o gene *ermB*. A presença do gene *msrC* em enterococos tem sido observada em animais silvestres (Oliveira de Araújo et al., 2020) e a literatura descreve o gene como específico para *E. faecium* (Portillo et al., 2000), o que confirma a evidência levantada, em que treze das doze amostras positivas para o gene eram da espécie. A presença de cepas com elevadas frequências de redução da suscetibilidade a eritromicina pode ser relacionada com o fato que os macrolídeos tem sido muito utilizado na medicina veterinária para tratamento de infecções bacterianas que afetam grandes e pequenos animais (Portillo et al., 2000).

Os genes *tetL* e *tetM* foram testados nas 18 cepas que apresentaram redução da sensibilidade para a tetraciclina e apresentaram altas taxas de detecção. Metade das amostras foram positivas para a presença de *tetL* e 72,2% para *tetM*, o que demonstra resultados condizentes com outros estudos anteriores que avaliaram a presença desses genes em enterococos de animais silvestres, como no estudo de Oliveira de Araújo (2019). A elevada frequência com que o gene *tet* foi detectado pode ser atribuída à sua associação com plasmídeos presentes em elementos móveis ou conjugativos, o que facilita sua transferência entre os microrganismos (Clewell et al., 1995; Chopra & Roberts, 2001).

Com o objetivo de análise do perfil de suscetibilidade ao arsênio dos enterococos isolados das amostras de gatos-do-mato-grande, foi constatado que 7,4% das amostras possuíam fenótipo positivo. Considera-se que para ser considerado tolerante ao arsênio, as cepas devem exibir uma concentração mínima inibitória (CIM) igual ou maior que 8 mM. no arsenato de sódio. A partir deste resultado, foram realizados testes para o genótipo de resistência ao arsênio das amostras fenotipicamente positivas, avaliando a presença do gene *ars*, que é o mais comum para o arsênio e possui diversas variantes. Entretanto, na análise da presença do gene *arsA\_II* todas as amostras apresentaram resultados negativos, o que não significa que a cepa

não possui a presença do gene *ars*, pois como identificado por Rebelo e colaboradores (2021), existem treze genes de *arsAI* a *arsAXIII*, sugerindo, então, a possibilidade da presença de outro gene nas cepas fenotipicamente positivas. Além disso, o estudo de Rebelo e colaboradores (2021) também constatou maior frequência de genes positivos para o arsênio em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*, o que corrobora com as análises fenotípicas feitas no estudo.

O genótipo das amostras para tolerância ao cobre foi realizado em busca do gene *tcrB* porém nenhum resultado positivo foi encontrado, provavelmente devido a necessidade de uma alta concentração de exposição ao metal para o desenvolvimento de tolerância. O gene *tcrB* é um gene de resistência transmissível que confere alta tolerância ao cobre em cepas de enterococos. As cepas que carregam esse gene exibem uma CIM de 24 mM para CuSO<sub>4</sub>, enquanto as cepas que não possuem esse gene normalmente apresentam uma CIM variando de 2 a 8 mM (Hasman e Aarestrup, 2002).

Todas essas evidências são essenciais para avaliarmos os riscos que o meio ambiente sofre frente às atividades humanas. Isto é, as coletas foram realizadas na cidade de Candiota, que possui grandes fábricas cimenteiras e usinas termelétricas, além de extensas faixas de áreas agrícolas, com cultivos de arroz e zonas pecuárias. O ecossistema dos animais que habitam a região sofre grandes impactos pelas atividades humanas, obrigando-os a adaptar os seus hábitos à essa realidade.

Resíduos de fábricas que podem liberar metais pesados e o uso abusivo de antimicrobianos na agricultura animal, são grandes fatores de influência para a contaminação dos solos e efluentes, tornando os organismos vivos suscetíveis a contaminação e ao desenvolvimento de mecanismos de tolerância a esses compostos tóxicos. Além disso, a fragmentação do habitat força a vida selvagem a procurar novos locais para habitar e a buscar fontes de alimento cada vez mais distantes, que por muitas vezes, são regiões muito próximas a áreas urbanas.

## 6. CONCLUSÃO

Foi identificado isolados de bactérias do gênero *Enterococcus* sp. em amostras de suabes retais e orais de gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), com maior prevalência da espécie *E. faecalis*.

As cepas de enterococos demonstraram resistência fenotípica a todos os antimicrobianos testados, com exceção da gentamicina. Observou-se os genes de resistência à tetraciclina e à eritromicina nas amostras fenotipicamente resistentes, com alta frequência para os genes *msrC*, *tetL* e *tetM*.

Seis cepas testadas para concentração inibitória mínima (CIM) de arsenato de sódio apresentaram tolerância ao composto, apesar de não possuírem resultados positivos para os genes analisados.

Em vista dos resultados do presente estudo, que indicam contaminação dos gatos-do-mato-grande com antimicrobianos e metais pesados presentes no ambiente, pode-se inferir que, a contaminação ambiental causada pelas atividades humanas impacta direta e indiretamente o ecossistema natural, podendo prejudicar espécies animais e vegetais e resultando em consequências irreversíveis para a natureza.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F. et al. Lista de mamíferos do Brasil. **Comitê de Taxonomia da Sociedade Brasileira de Mastozoologia (CT-SBMz)**, 2020. Disponível em: <https://www.sbmz.org/mamiferos-do-brasil/>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- ALMEIDA, L. B. de; QUEIROLO, D.; OLIVEIRA, T. G. de; BEISIEGEL, B. de M. Avaliação do risco de extinção do Gato-do-mato *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 84-90, 2013.
- AKTAN, Y.; TAN, S.; ICGEN, B. Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 5285-5293, 2013.
- ARGUDÍN, M. A. et al. Heavy metal resistance in bacteria from animals. **Research in Veterinary Science**, v. 122, p. 132-147, 2019.
- ARGÜELLO, J. M. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. **The Journal of Membrane Biology**, v. 195, n. 2, p. 93-108, 2003. DOI: 10.1007/s00232-003-2048-2.
- ANTUNES, W. M. et al. An evaluation of copper biosorption by a brown seaweed under optimized conditions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 174-184, 2003.
- BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z. R.; HARWOOD, V. J. Enterococci in the environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, p. 685-706, 2012.
- CARTWRIGHT, C. P.; STOCK, F.; FAHLE, G. A.; GILL, V. J. Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1931-1933, 1995. DOI: 10.1128/jcm.33.7.1931-1933.1995.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- CLEWELL, D. B.; FLANNAGAN, S. E.; JAWORSKI, D. D. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 1995.
- CODY, W. L.; WILSON, J. W.; HENDRIXSON, D. R.; MCIVER, K. S.; HAGMAN, K. E.; OTT, C. M.; SCHURR, M. J. Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 135-138, 2008.
- CONNELL, S. R.; TRACZ, D. M.; NIERHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3675-3681, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.12.3675-3681.2003.

D’COSTA, V.; KING, C.; KALAN, L. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457-461, 2011. DOI: 10.1038/nature10388.

DE NIEDERHÄUSERN, S.; BONDI, M.; ANACARSO, I.; ISEPPI, R.; SABIA, C.; BITONTE, F.; MESSI, P. Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 48, n. 8, p. 939-946, 2013.

DE SÁ DEL FIOL, F.; DE MATTOS FILHO, T. R.; GROppo, F. C. Resistencia bacteriana. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 10, p. 1129-1140, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.20453/rmh.v9i2.2384>. Acesso em: 16 ago. 2024.

ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Brazil’s heavy metal pollution harms humans and ecosystems. **Science of One Health**, v. 2, 100019, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soh.2023.100019>.

ENGLE, T. E. Copper and lipid metabolism in beef cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 591-596, 2011.

ERIK, L.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957-964, jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4mt00327f>.

FERNANDEZ, R.; LUCAS, E.; MCGINNIS, J. Influence of diet composition on chick growth response to different antibiotics, feed additives and combination of the additives. **Poultry Science**, v. 52, n. 6, p. 2299-2305, 1973.

FISHER, K.; PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FRAZZON, A. P. G. et al. 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**, v. 26, p. 365-370, 2010.

GACA, A. O.; LEMOS, J. A. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, e00008-19, 2019.

GARCÍA, L. A. et al. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from wild mammals in Aragón, Spain. **Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 151-159, 22 abr. 2022. DOI: 10.2478/jvetres-2022-0020.

GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y., et al. (Eds.). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection** [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

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

GRASSOTTI, T. T. et al. Antimicrobial resistance profiles in *Enterococcus* spp. isolates from fecal samples of wild and captive Black Capuchin Monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2366, 2018.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILO, A. B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25-39, 2018.

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

HASMAN, H.; AARESTRUP, F. M. *tcxB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1410-1416, 2002.

HASMAN, H. et al. Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcxB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5784-5789, 2006.

HECK, J. M. da S.; PRICHULA, J.; HUFF, R.; OLIVEIRA, R. B. de; SILVA-SOARES, T.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Captive snakes from Brazil as carriers of multidrug-resistant enterococci. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 11, n. 3, p. 503-523, 2021.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Antibiotic resistance: moving from individual health norms to social norms in One Health and global health. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1914, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01914.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HUFF, R. et al. Antimicrobial resistance and genetic relationships of enterococci from siblings and non-siblings *Heliconius erato phyllis* caterpillars. **PeerJ**, v. 8, e8647, 2020.

KIRBY, B. Sherris and Turck, Performance standards for antimicrobial disc susceptibility. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y., et al. (Eds.). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection** [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

LAUKOVÁ, A.; STROMPFOVÁ, V.; SIMONOVÁ, M.; STYRIAK, I.; SWIECICKA, I. Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. **Folia Microbiologica**, v. 53, p. 173-178, 2008.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J.; GILMORE, M. S. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection** [Internet]. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>. Acesso em: 13 ago. 2024.

- MAGNANI, D.; SOLIOZ, M. Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of Cop operon of *Enterococcus hirae*. **BioMetals**, v. 18, p. 407-412, 2005.
- MANFREDI, C.; LUCHERINI, M.; CANEPUCCIA, D.; CASANAVE, E. B. Geographical variation in the diet of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in Pampas Grassland of Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 4, p. 1111-1115, 2004.
- MEYER, K.; SCHONFELD, H. Über die Unterscheidung des *Enterococcus* von *Streptococcus viridans* und die Beziehung beider zum *Streptococcus lactis*. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. 1, Orig.**, v. 99, p. 402-416, 1926.
- MIGLIORINI, R. P.; PETERS, F. B.; FAVARINI, M. O.; KASPER, C. B. Trophic ecology of sympatric small cats in the Brazilian Pampa. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0201257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201257>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.
- MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 46-65, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.3.1.46>. Acesso em: 16 ago. 2024.
- NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, n. 1, p. 17-32, 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x.
- NIES, D. H. Metals and their compounds in the environment. Part II. In: ANKE, K.; IHNAT, M.; STOEPLER, M. (Eds.). **The elements: essential and toxic effects on microorganisms**. Weinheim: Wiley, 2004.
- NOVAIS, C.; CAMPOS, J.; FREITAS, A. R.; BARROS, M.; SILVEIRA, E.; COQUE, T. M.; PEIXE, L. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 1102-1112, 2018.
- OLIVEIRA DE ARAUJO, G. et al. Multidrug resistance in enterococci isolated from wild pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and Geoffroy's Cats (*Leopardus geoffroyi*) in the Brazilian Pampa Biome. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 606377, 2020.
- OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. Guia de campo dos felinos do Brasil. São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sociedade de Zoológicos do Brasil, **Pró-Vida Brasil**, 2005.
- PASQUAROLI, S.; DI CESARE, A.; VIGNAROLI, C.; CONTI, G.; CITTERIO, B.; BIAVASCO, F. Erythromycin-and copper-resistant *Enterococcus hirae* from marine sediment and co-transfer of erm(B) and tcrB to human *Enterococcus faecalis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 1, p. 26-28, 2014.
- PEREIRA, J.; LUCHERINI, M.; TRIGO, T. *Leopardus geoffroyi*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2015. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/15310/50657011>. Acesso em: 10 ago. 2024.



PEREIRA, J. A.; FRACASSI, N. G.; RAGO, V.; FERREYRA, H.; MARULL, C. A.; MCALOOSE, D.; UHART, M. M. Causes of mortality in a Geoffroy's cat population – a long-term survey using diverse recording methods. **European Journal of Wildlife Research**, v. 56, p. 939-942, 2010.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

POETA, P.; COSTA, D.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; RUIZ-LARREA, F.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 395-402, 2005.

PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTINEZ, J. L.; TORRES, C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 967-971, 2000. DOI: 10.1128/AAC.44.4.967-971.2000.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.

PRICHULA, J. et al. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, n. 1, p. 51-57, 2016.

REBELO, A.; MOURÃO, J.; FREITAS, A. R.; DUARTE, B.; SILVEIRA, E.; SANCHEZ-VALENZUELA, A.; NOVAIS, C. Diversity of metal and antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. from the last century reflects multiple pollution and genetic exchange among phyla from overlapping ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147548, 2021.

RIO GRANDE DO SUL. Decreto Estadual nº 51.797, de 08 de setembro de 2014. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 08 set. 2014.

ROBERTS, M. C. Mechanisms of resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 2, p. 17-21, 2002. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00323-5.

ROBERTS, M. C.; SCHWARTZ, S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment and humans. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, p. 576-592, 2016.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1-24, 1996. DOI: 10.1016/0168-6445(95)00011-9.

ROSEN, B. P.; LIU, Z. J. Transport pathways for arsenic and selenium: a mini review. **Environmental International**, v. 35, p. 512-515, 2009.

- SANTESTEVAN, N. A. et al. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1935-1946, 2015.
- SAUGET, M.; VALOT, B.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 447-455, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.
- SCHONEWALD-COX, C. M.; BUECHNER, M. Park protection and public roads. In: FIDLER, P. L.; JAIN, S. K. (Eds.). **Conservation Biology: The Theory and Practice of Nature Conservation, Preservation, and Management**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 373-396.
- SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 399, 2012.
- SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 47, 2013.
- SILVA, V. L. da et al. Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2012.
- SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. **Gene**, v. 179, p. 9-19, 1996.
- SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 753-789, 1996.
- SOUSA, K. S.; BAGER, A. Feeding habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 73, n. 4, p. 303-308, 2008.
- SUTCLIFFE, J. et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2562-2566, 1996
- TIRELLI, F. P. et al. Density and spatio-temporal behaviour of Geoffroy's cats in a human-dominated landscape of southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 99, n. 1, p. 128-135, 2019.
- TIRELLI, F. P. et al. Spatial organization and social dynamics of Geoffroy's cat in the Brazilian pampas. **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 4, p. 859-873, 2018.
- TORTATO, M. A. **From large to small-scale: drivers of Geoffroy's cat diet across South America and features of life-history in a human-modified landscape on southern Brazil**. 2019. 98 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2019.
- TRIGO, F. et al. 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**, v. 48, n. 2, p. 157-166, 2013. DOI: 10.1080/01650521.2013.774789.

TURE, M.; ALTINOK, I.; ALP, H. Effects of cage farming on antimicrobial and heavy metal resistance of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus garvieae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 9, p. 1422-1430, 2018.

TSAI, S. L. et al. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 659-667, 2009.

VIGNAROLI, C.; PASQUAROLI, S.; CITTERIO, B.; DI CESARE, A.; MANGIATERRA, G.; FATTORINI, D.; BIAVASCO, F. Antibiotic and heavy metal resistance in enterococci from coastal marine sediment. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 406-413, 2018.

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

XIMÉNEZ, A. Notas sobre felidos neotropicales III: contribución al conocimiento de *Felis geoffroyi* d'Orbigny and Gervais, 1844 y sus formas geográficas (Mammalia, Felidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 27, p. 31-43, 1973.

XU, C. et al. Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. **The Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 16-23, 1998.

XU, J.; XU, Y.; WANG, H.; GUO, C.; QIU, H.; HE, Y.; ZHANG, Y.; LI, X.; MENG, W. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. **Chemosphere**, v. 119, p. 1379-1385, 2014.

YU, Z. et al. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. **Food Microbiology**, v. 64, p. 23-32, 2017.

ZBIDEN, R. Trends in antibiotic resistance among respiratory tract pathogens in children in two regions near France, a high level resistance country. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 165, n. 1-2, 2006.

### Dissertações

ARAÚJO, G. O. D. **Estudo de *Enterococcus* sp. isolados de canídeos e felídeos selvagens do Pampa brasileiro**. 2019. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DONATO, S. T. **Comparison of conventional and semi-automatized methods to identify *Enterococcus* spp versus molecular biology in discrepant identifications**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GRASSOTI, T. ***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**. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do

Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LIMA, L. B. Determinação de metais pesados: zinco, cádmio, chumbo e cobre, em águas de região de manguezais nos municípios de Raposa e São Luiz, utilizando a Voltametria. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Química Industrial. Universidade Federal do Maranhão.

MEDEIROS, A. W. **Assessment of the presence of virulence factor genes and in vitro biofilm formation capacity among food and clinical isolates of *Enterococcus* sp.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SECO, F. D. A. C. P. G. S. **Associação da resistência a metais e a antibióticos em *Enterococcus* spp de origem animal.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

### Capítulos de livros

PETERS, F. B. et al. Caça preventiva ou retaliativa de felinos por humanos no extremo sul do Brasil. In: CASTAÑO-URIBE, C. (ed.). **Conflictos entre felinos y humanos en América Latina.** Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), 2016. p. 311-325. (Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical).

PILLAR, V. D. P.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. J. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. Disponível em: <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Livros/CamposSulinos.pdf>.

### Livros

AGARWAL, S. K. *Heavy Metal Pollution.* S.B. Nangia: A.P.H. **Publishing Corporation,** 2009. (Vol. 4).

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Buenos Aires: **Fundación Vida Silvestre Argentina,** 2004. 19 p.

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Buenos Aires: **Fundación Vida Silvestre Argentina,** 2004. 19 p.

PEREIRA, J. A.; APRILE, G. **Felinos de sudamérica.** Buenos Aires, Argentina: Londaiz Laborde Ediciones, 2012. 104 p.

### Material disponível na internet

DEMORI, J. Projeto “Felinos do Pampa” - Pró-Carnívoros. Disponível em: <<https://procarnivoros.org.br/projeto-felinos-do-pampa/>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

FELINOS do Pampa: os novos farrapos lutam contra a extinção. Disponível em: <https://oeco.org.br/analises/29144-felinos-do-pampa-os-novos-farrapos-lutam-contra-a-extincao/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

PROJETO DE MONITORAMENTO DO DESMATAMENTO DOS BIOMAS BRASILEIROS POR SATÉLITE – PMDBBS. Disponível em: [https://siscom.ibama.gov.br/monitora\\_biomass/PMDBBS%20-%20PAMPA.html](https://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/PMDBBS%20-%20PAMPA.html). Acesso em: 15 ago. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Newsroom spotlight: 10 global health issues to track in 2021**. Disponível em: <https://www.who.int/newsroom/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>. Acesso em: 16 ago. 2024.