

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE  
*Enterococcus* SP. ISOLADOS DE AMOSTRAS ORAIS DE MACACOS-PREGO DA  
ESPÉCIE *Sapajus nigritus* ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ DO SUL,  
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

DEJOARA DE ANGELIS ZVOBODA

PORTO ALEGRE

2017/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA DE  
*Enterococcus* SP. ISOLADOS DE AMOSTRAS ORAIS DE MACACOS-PREGO DA  
ESPÉCIE *Sapajus nigrurus* ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ DO SUL,  
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

**Autor: Dejoara de Angelis Zvoboda**

**Trabalho apresentado à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
obtenção da Graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientador: Profa Dra. Ana Paula Guedes  
Frazzon**

PORTO ALEGRE

2017/2

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Jorge por estar sempre ao meu lado quando eu mais preciso e por todo o esforço para que eu pudesse realizar meus sonhos. À minha mãe Sônia, mesmo que nem sempre junto comigo, mas sempre me apoiando e me incentivando mesmo que as coisas não estivessem tão bem quanto gostaríamos. Sou eternamente grata pela amizade e pelo empenho dos dois em me manter estudando.

Aos meus irmãos Jorge e Tadeu por serem meus exemplos de pais, profissionais e amigos.

Às minhas colegas de graduação por compartilhar as reclamações, os lanches, as noites mal dormidas e o chimarrão para não dormir na aula depois de uma noite de plantão. Em especial à Melina pela parceria e amizade que só crescem proporcionalmente às dificuldades que nos são impostas.

À minha orientadora Ana Paula por me incentivar e acreditar no meu trabalho desde a época da iniciação científica, em 2013, e por mostrar-se sempre disponível para me ouvir e me receber.

Aos colegas do laboratório 222C pela ajuda, pela força, pelo incentivo, pela descontração nos momentos de trabalho intenso e pela amizade. Em especial à mestranda Tiela pela paciência e companheirismo em todos os nossos experimentos.

Por fim, agradeço aos animais pelo retorno em cada olhar e em cada gesto de amor que nos faz acreditar nessa profissão.

## RESUMO

*Enterococcus* são bactérias gram-positivas encontradas de forma comensal no trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo considerados microrganismos sentinela quando encontrados fora destes. Devido à estreita relação entre os primatas e os humanos e à falta de estudos sobre a microbiota oral de macacos-pregos da espécie *Sapajus nigritus* (*S. nigritus*) viu-se a necessidade de avaliar a diversidade de espécies de enterococos, o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e a presença de genes de resistência. Foram coletados suabes orais de seis macacos-pregos selvagens no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. O gênero e as espécies foram identificados pela reação em cadeia de polimerase (PCR). A suscetibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo método de disco difusão em ágar e presença dos genes de resistência *aac(6')-aph(2'')*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mrsC*, *gyrA*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB* e *vanC* foi avaliada pela PCR. Noventa e seis isolados foram selecionados, sendo 64 cepas de enterococos, destas 48 (75%) foram identificadas como *E. faecalis*, 12 (19%) como *E. casseliflavus* e 4 (6%) como *E. hirae*. As propriedades de resistência foram detectadas para rifampicina (27%), eritromicina (19%), quinolonas (8%) e nitrofurantoína (2%) e 37 (57,8%) cepas foram sensíveis aos dez antimicrobianos testados. Das 12 cepas com resistência intermediária a eritromicina nenhuma foi positiva para os genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* e *mrsC*. Em conclusão, diferentes espécies de enterococos fazem parte da microbiota oral de macacos-pregos e a presença de elementos de resistência podem estar relacionadas a fatores antropogênicos ou ter origem no resistoma ambiental.

**Palavras-chave:** primatas, microbiota oral, resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Enterococcus* are gram-positive bacteria found in commensal form in the gastrointestinal tract of humans and animals, being sent sentinel microorganisms when found for these. Due to the close relationship between primates and humans and the lack of studies on an oral microbiota of capuchin monkeys of the species *Sapajus nigritus* (*S. nigritus*), it was necessary to evaluate the diversity of enterococci species, the susceptibility profile antimicrobials and the presence of resistance genes. Oral swabs were collected from six wild capuchin monkeys in the municipality of Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. The genus and species as identified by the polymerase chain reaction (PCR). Antimicrobial susceptibility was determined by the agar diffusion method and the presence of resistance genes *aac* (6') - *aph* (2'), *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *mrsC*, *gyrA*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB* and *vanC* was evaluated by PCR. Ninety-six isolates were selected, of these 64 strains were identified as enterococci, and 48 (75%) were identified as *E. faecalis*, 12 (19%) as *E. casseliflavus* and 4 (6%) as *E. hirae*. Resistance properties were detected for rifampicin (27%), erythromycin (19%), quinolones (8%) and nitrofurantoin (2%) and 37 (57.8%) strains were sensitive to the ten antimicrobials tested. Of the 12 strains intermediate resistance to erythromycin, none were positive for the *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C) and *mrsC* genes. In conclusion, different species of enterococci are part of the oral microbiota of capuchin monkeys and the presences of resistance elements could be related to anthropogenic factors or originate from the environmental resistome.

**Keywords:** antimicrobial resistance, primates, oral microbiota.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Caracterização dos isolados e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) .....	13
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição de espécies de enterococos isolados da mucosa oral de macacos-prego .....	14
<b>Tabela 3.</b>	Perfil de resistência intermediária aos antimicrobianos das cepas de enterococos isoladas dos suabes orais de macacos-pregos selvagens de acordo com a espécie de enterococos encontrada .....	17

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Coleta das Amostras de Suabe Oral</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Isolamento das Cepas de <i>Enterococcus</i> spp.</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Identificação de Gênero e Espécie por PCR</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>Deteção dos Genes de Resistência</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>19</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Enterococcus* são bactérias gram-positivas, habitantes do trato intestinal de humanos e de diversas espécies animais. Apesar de serem microrganismos comensais, são considerados sentinela para contaminação quando encontrados fora do organismo animal. Até o momento, já foram descritas 55 espécies isoladas de diferentes espécies animais, sendo *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus* e *Enterococcus hirae* as mais importantes (LPSN – *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*, 2017). *Enterococcus* são patógenos oportunistas, constituindo a terceira causa de infecção adquirida no ambiente hospitalar (IAAH), sendo *E. faecalis* a espécie predominante seguida de *E. faecium* (LEBRETON ET AL., 2014).

O gênero *Enterococcus* tem sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente prevalência nas IAAH, mas pelo elevado número de cepas resistentes ou multi-resistentes aos antibióticos. Enterococos são intrinsicamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina e também possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência, apresentando resistência adquirida aos antibióticos rotineiramente utilizados tanto na medicina humana como animal (SANTOS ET AL., 2013; DEVRIESE ET AL., 2006). Cepas resistentes aos antimicrobianos já foram isolados de diversos tipos de amostras, incluindo animais selvagens (POETA ET AL., 2005; POETA ET AL., 2007; LEBRETON ET AL., 2014; SANTESTEVAN ET AL., 2015; PRISCHULA ET AL., 2016).

Os macacos-prego da espécie *Sapajus nigritus* ocorrem em várias regiões do país, incluindo a região Sul, sendo exclusivos da América do Sul (*International Union for*

*Conservation of Nature* - IUCN, 2017; VILANOVA ET AL., 2005). No Brasil, são encontrados em diversos ambientes em que o homem está incluso, como zoológicos, áreas de reabilitação e pesquisa, zonas urbana e rural (FERREIRA ET AL., 2015). Sabendo-se da crescente proximidade dos animais com o contato humano através da busca por alimentos, e que essa relação proporciona a transmissão de agentes etiológicos de doenças importantes, como os do gênero enterococos, por exemplo, responsáveis por causar, principalmente doença periodontal tanto na espécie humana, quanto em primatas (WIGGS & HALL, 2003). Somado à habilidade dessas bactérias em formar biofilmes, estas podem ser consideradas agentes causadores de doenças periodontais graves (WERNER, 2013). Pinto (2016), em um estudo com primatas do zoológico de Goiás verificou a incidência de doença periodontal em 100% dos primatas analisados.

Apesar do crescente número de estudos avaliando a presença e o perfil de resistência de enterococos nos mais diversos nichos, pesquisas empregando animais silvestres não são muito noticiadas, provavelmente, devido à dificuldade em se obter amostras. Diante disso, a análise dos enterococos como um grupo de bactérias com importância clínica e ambiental, e que já teve sua composição averiguada e monitorada em diferentes habitats, pode apontar aspectos importantes a respeito das interações e distúrbios ambientais.

Esse trabalho teve como propósito avaliar a diversidade de espécies de *Enterococcus* sp. presente na cavidade oral de macacos-prego selvagens da espécie *S. nigritus* e observar o perfil de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas. A presença de cepas resistentes isoladas a partir de animais selvagens reforça a influência de fatores antropogênicos sobre a microbiota normal do animal. Com isso, pretende-se avaliar o impacto da exposição desses animais ao ambiente doméstico a partir do perfil de resistência da bactéria sentinela. Tendo-se em vista a deficiência de estudos na área, torna-se de extrema importância traçar esse perfil microbiológico a fim de construir um banco de dados para a espécie *S. nigritus*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SUABE ORAL

Foram coletados suabes orais de seis macacos-prego selvagens da espécie *Sapajus nigrinus* no dia 23 de Maio de 2017, no Parque da Gruta (29°43'59" Sul e 52°24'52" Oeste) no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Os macacos foram capturados e manipulados pela equipe de médicos veterinários do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) utilizando gaiolas do tipo Tomahawk.

As amostras foram coletadas a partir da introdução de suabe estéril na cavidade oral dos animais. Os suabes foram armazenados em meio de transporte Stuart (Kasvi, Paraná, Brasil) até chegada ao laboratório para análise. As amostras foram transportadas até o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) no Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Ao final da coleta, os animais foram devolvidos ao seu habitat.

### 2.2 ISOLAMENTO DAS CEPAS DE *Enterococcus* SPP.

Para isolamento de *Enterococcus* sp., as amostras foram incubadas em tubos de vidro previamente esterilizados contendo água peptonada tamponada para pré enriquecimento não seletivo durante 24h a 35°C ± 1°C. Uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi, então, inoculada em meio seletivo Caldo Azida Dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada durante 24h a 35°C ± 1°C. Diluições seriadas da suspensão obtida do Caldo Azida Dextrose de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-4</sup> foram plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície (Spread plate) no volume de 0,1 mL em meio Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHIA) (Acumedia

Lansing, Michigan, EUA) acrescentado de 6,5% NaCl, as placas foram incubadas por 48h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Esse ensaio foi realizado em duplicata e foram feitas as contagens das Unidades Formadoras de Colônia de cada amostra na diluição de  $10^{-4}$  da técnica de espalhamento em placa.

A partir do crescimento em placa, foram selecionadas aleatoriamente 16 colônias que apresentaram crescimento. Cada uma destas foi transferida para meio Ágar Bile Esculina (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas durante 24h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , a fim de analisar a capacidade da amostra em hidrolisar a esculina. Após o período de incubação, as colônias que apresentaram as características morfológicas e tintoriais condizentes com o gênero pesquisa do foram plaqueadas em meio BHIA e incubadas por 24h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A partir destas amostras foram realizados os testes de catalase e coloração de gram para uma identificação presuntiva do gênero *Enterococcus*.

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO E ESPÉCIE POR PCR

O DNA total das células bacterianas foi extraído pelo método de lise térmica conforme Donato (2007). A confirmação molecular de gênero foi realizada através da reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5'-TACTGACAAACCATTCATGATG -3' e 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC -3', referentes ao gene *tuf* (KE ET AL., 1999) e o equipamento Termociclador – 2720 ThermalCycler® (Applied Biosystems, Life Technologies®) conforme Santestevan *et al.*, (2015). Como controle positivo, foi empregada a cepa referência *E. faecalis* ATCC 29212. Foram consideradas positivas para o gênero as amostras que amplificaram o fragmento de tamanho de 112 pares de base. Os isolados identificados como enterococos foram

armazenados em microtubos a -20°C, em solução de 1 mL de meio de preservação (leite em pó desnatado com 10% de glicerol) (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brasil).

Para a identificação das espécies se pela técnica de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada espécie nas condições de reação adequadas. Como controles positivos foram utilizadas as cepas *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274, *E. casseliflavus* J1, *E. gallinarum* F1, *E. hirae* C1 e *E. mundtii* J5.

Para as ampliações foram empregadas as seguintes condições para cada reação: 1 µL de DNA total; 18,05 µL de água bidestilada; 2,5 µL do tampão 10x PCR; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase a 5 U/µL (QuatroG, Rio Grande do Sul, Brasil); 0,5 µL de cada dNTP a 10 mM (USB, Cleveland, Ohio, Estados Unidos); e 1 µL a 0,1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Califórnia, EUA).

A visualização dos produtos da amplificação da PCR foi feita eletroforese em gel de agarose a 1,5% com trisacetato-EDTA (TAE) corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um volume de 8 µL do produto foi adicionado ao gel que, então, foi submetido a uma voltagem de 60 volts por 100 minutos para que ocorresse a migração dos amplicons. O gel foi visualizado em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia<sup>®</sup>, Molecular Imaging).

## **2.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Para o teste de suscetibilidade *in vitro* a antimicrobianos, foi utilizado o método de disco-difusão em ágar descrito por Kirby e Bauer (CLSI, 2012). As amostras foram avaliadas quanto à suscetibilidade aos seguintes antimicrobianos: ampicilina 10µg, ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, eritromicina 15µg, estreptomicina 300µg, gentamicina 120µg, linezolida

30µg, nitrofurantoína 300µg, norfloxacin 10µg, rifampicina 5µg, tetraciclina 30µg e vancomicina 30µg. As amostras foram incubadas em placas contendo meio Ágar Mueller Hinton (Kasvi, Curitiba, Brasil) em espessura de 5 mm, adicionados de doze discos antimicrobianos para que houvesse a difusão destes e posterior análise dos halos de inibição de crescimento. O diâmetro dos halos de inibição foi analisado após incubação por 18 a 24 h, em aerobiose a 37°C ± 1°C. De acordo com as medidas destes, as amostras foram classificadas entre suscetíveis, intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos testados.

## 2.5 DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

As amostras que apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos foram selecionadas para caracterização genética. Estes isolados foram testados pelo método da PCR para detecção dos seguintes genes: *aac(6')-aph(2'')* nos isolados resistentes aos aminoglicosídeos; *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* e *mrsC* nos resistentes à eritromicina; *gyrA* nos resistentes às quinolonas; *tetL*, *tetM* e *tetS* nos resistentes à tetraciclina; e *vanA*, *vanB* e *vanC* nos isolados resistentes aos glicopeptídeos. Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia<sup>®</sup>, Molecular Imaging).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 6 suabes orais dos macacos-pregos selvagens capturados denominados de MP23O, MP24O, MP25O, MP26O, MP27O e MP28O, foram feitas as contagens das Unidades Formadoras de Colônia para cada amostra, na diluição de  $10^{-4}$  da técnica de espalhamento em placa. As amostras apresentaram entre  $1,7 \times 10^6$  UFC (MP26O) e  $1,9 \times 10^5$  UFC (MP27O) (tabela 1).

**Tabela 1 – Caracterização das amostras e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).**

AMOSTRA	SEXO *	IDADE	UFC (UFC/ml)
MP23O	M	Adulto	$2,8 \times 10^5$
MP24O	M	Adulto	$1,1 \times 10^6$
MP25O	M	Jovem	$7,8 \times 10^5$
MP26O	F	Adulto	$1,7 \times 10^6$
MP27O	M	Adulto	$1,9 \times 10^5$
MP28O	M	Adulto	$1,4 \times 10^6$

\*M: masculino e F: Feminino

Dezesseis colônias aleatórias foram selecionadas de cada amostra, totalizando 96 colônias. Das colônias selecionadas, 64 (68,08%) foram identificadas como pertencentes ao gênero enterococos, apresentando características fenotípicas de diplococos Gram positivos, teste da catalase negativa e a hidrólise de esculina na presença de 40% de bile positiva. Todas as 64 cepas apresentaram o fragmento de DNA de 112pb esperado na identificação molecular do gênero.

As amostras foram então submetidas à identificação da espécie por PCR. Dos 64 isolados submetidos ao PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para as espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, 61 (95,31%)

amplificaram para uma das espécies testadas. Três amostras não puderam ser identificadas pela técnica da PCR e foram submetidas à reação de Maldi tof. Após reunir os dados das identificações por PCR e Maldi tof, observou-se que a espécie mais frequentemente detectada nos suabes orais de macacos-pregos selevagem era *E. faecalis* (75%), seguida de *E. casseliflavus* (19%) e *E. hirae* (6%). A distribuição das espécies de enterococos isolados da mucosa oral de macacos-prego pode ser observada na Tabela 2.

**Tabela 2 – Distribuição de espécies de enterococos isolados da mucosa oral de macacos-prego.**

ESPÉCIES	Nº DE ESPÉCIES ISOLADAS (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	48 (75)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	12 (19)
<i>Enterococcus hirae</i>	4 (6)
<b>TOTAL</b>	<b>64 (100)</b>

A escassez de estudos que avaliam a microbiota oral de mamíferos selvagens, mais especificamente sobre enterococos, impossibilitou a comparação direta dos resultados obtidos no presente trabalho. Os enterococos são comuns na cavidade oral de humanos e sua origem na cavidade oral pode estar relacionada a duas fontes principais. Segundo Jiménez *et al.* (2013), o leite materno é uma via de transmissão de cepas de enterococos ao trato gastrointestinal de animais juvenis. No estudo, eles analisaram amostras de leite materno de diferentes espécies e identificaram *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* e *E. durans* nas amostras. Sendo *E. faecalis* a mais abundante e a única espécie presentes em todas as amostras de mamíferos incluídas no estudo. Em um estudo conduzido por Yukio Komiyama *et al.* (2016), diferentes espécies de enterococos foram identificadas em suabes orais de humanos e *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente detectada (88,7%) nas

amostras. Em humanos *E. faecalis*, além de fazer parte da microbiota oral, é também relacionada com doenças bucais, como cáries, infecções endodônticas, periodontite e implantes. Primatas não humanos, como os da espécie *S. nigritus* possuem alta incidência de doenças periodontais devido principalmente a dietas inadequadas similares a de humanos, o que pode estar relacionado à presença de bactérias do gênero enterococos (PINTO, 2016). Segundo Moreira *et al.* (2003), o gênero mais comumente encontrado na cavidade oral de primatas é *Staphylococcus* sp.

A segunda fonte baseia-se na composição da dieta destes animais. Segundo Foulquié *et al.* (2006), enterococos podem estar presentes no ambiente em alimentos de origem animal e vegetal fermentados. O que reforça a hipótese de que a alimentação de animais selvagens por humanos, mesmo que indiretamente, a partir de restos de comida, é uma importante ferramenta para a disseminação de agentes etiológicos comuns entre as espécies. A presença de *E. hirae* e *E. casseliflavus* na cavidade oral dos macacos-pregos esta diretamente relacionada com a dieta destes animais, que inclui artrópodes e plantas, e as espécies *E. hirae* e *E. casseliflavus* são mais frequentes em insetos e plantas e vegetais, respectivamente (LEBRETON ET AL., 2016).

Os resultados do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, observado para as 64 cepas testados podem ser verificados na Tabela 3. Considerando o total de cepas, 57,8% (37/64) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. As propriedades de resistência intermediária foram encontradas para rifampicina (26,56%), eritromicina (18,75%), ciprofloxacino (4,68%), norfloxacino (3,12%) e nitrofurantoína (1,53%). Todas as cepas foram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína, tetraciclina e vancomicina. Enterococos resistentes à eritromicina, rifampicina, nitrofurantoína, norfloxacina e ciprofloxacina ja foram observadas em amostras de animais selvagens (POETA ET AL., 2005; POETA ET AL., 2007; SANTESTEVAN ET

AL., 2015; PRISCHULA ET AL., 2016). A baixa frequência de cepas resistentes isoladas a partir destes animais são bastante coerentes uma vez que as condições dos habitats dos animais analisados são regiões de mata tendo pouca influência antropogênica.

**Tabela 3 – Perfil de resistência intermedária aos antimicrobianos das cepas de enterococos isoladas dos suabes orais de macacos-pregos selvagens de acordo com a espécie de enterococos encontrada.**

CEPAS (n)	NUMERO (%) DE CEPAS RESISTENTES A				
	CIP*	ERI*	NIT*	NOR*	RIF*
<i>E. faecalis</i> (48)	3 (6,25)	12 (25)	0 (0)	2 (4,16)	15 (31,25)
<i>E. casseliflavus</i> (12)	0 (0)	0 (0)	1 (8,33)	0 (0)	2 (16,66)
<i>E. hirae</i> (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total (64)</b>	<b>3 (4,68)</b>	<b>12 (18,75)</b>	<b>1 (1,56)</b>	<b>2 (3,12)</b>	<b>17 (26,56)</b>

\*CIP (ciprofloxacino 5µg), ERI (eritromicina 15µg), NIT (nitrofurantoína 300 µg), RIF (rifampicina 5µg).

A presença de cepas resistentes a antibióticos em *Enterococcus* spp. isolado em nossos estudos é motivo de preocupação, já que estes animais eram selvagens e não tinham história de exposição terapêutica a antibióticos. A análise de enterococos resistentes nesses animais podem apontar dois aspectos importantes: o impacto das atividades humanas no meio ambiente e ou o resistoma (WRIGHT 2007; STEWART ET AL., 2014). Em animais de companhia, como cães e gatos, há estudos comprovando a cohabitação de enterococos multiresistentes a antimicrobianos entre os animais e seus donos (JACKSON, 2009; LEITE MARTINS, 2014), o que reforça o alerta sobre o risco da proximidade com animais selvagens, uma vez que não se tem informações suficientes sobre sua microbiota patogênica e considerando a cavidade oral como grande disseminadora de doenças por mordeduras (JOHNSON, 2008). Portanto, mais estudos são necessários para entender os mecanismos de aquisição de resistência destes isolados e manter monitoração constante para o surgimento de novos genes envolvidos com a resistência aos antimicrobianos em animais selvagens.

As 12 (19%) cepas que apresentaram resistência intermediária à eritromicina foram submetidas à reação de PCR para análise da presença dos genes de resistência *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* e *mrsC* e nenhuma das cepas apresentou-se positiva. Os genes avaliados são os mais frequentemente detectados entre as cepas de enterococos resistentes aos macrolídeos. Sendo que o mecanismo mais difundido de resistência aos macrolídeos é mediado pela metilação de uma adenina específica no resíduo do 23S rRNA e está associado com o gene *erm (B)* (AARESTRUP ET AL., 2001). Este gene é frequentemente observado em enterococos de origem animal e é relatado como o gene mais comum para resistência a macrolídeos (POETA ET AL. 2007; CASSENEGO ET AL., 2011; LEBRETON ET AL. 2014). Como nenhum dos genes foram observados é possível que outros genes, menos frequentes como o *erm (D)*, (E), (F), (G), (Q) e o bomba de efluxo macrolídico *msr(A)*, possam estar relacionado com a resistência a eritromicina nestas cepas.

#### 4 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a microbiota predominante de enterococos isolados de suabes orais de macacos pregos selvagens do Rio Grande do Sul consiste, principalmente, das espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. hirae*. Todos os isolados estudados foram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína, tetraciclina e vancomicina. O perfil de resistência intermediária mais frequente foi para rifampicina, seguido de eritromicina, ciprofloxacino, norfloxacina e nitrofurantoína. Este é o primeiro estudo que relata a distribuição e o perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de enterococos isoladas isolados de suabes orais de macacos pregos selvagens do Rio Grande do Sul. A presença de cepas resistentes nos macacos-pregos pode estar relacionada com a proximidade deles com animais ou humanos e/ou com o resistoma ambiental.

## 5 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. *et al.* Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal *Enterococci* from Food Animals in Denmark. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Copenhagen, v. 45 p. 2054-2059, 2001.

ALLEN, H. K. *et al.* Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. **Nature**, v. 8, p. 251-259, april 2010.

CASSENEGO, A. P. V. *et al.* Species Distribution and Antimicrobial Susceptibility of *Enterococci* Isolated from Broilers Infected Experimentally with *Eimeria* spp. and Fed with Diets Containing Different Supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n. 42, p. 480-488, 2011.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Approved Standard - Twelve Edition**. 2012. Wayne, PA. CLSI document M02-A11. 32 - 58p.

DONATO, S. T. **Comparação de Métodos Convencionais e Semi-automatizados para Identificação de *Enterococcus* spp. Frente à Biologia Molecular em Identificação Discrepantes**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007. 85p

DEVRIESE, L., BAELE, M., BUTAYE, P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANDT, E., ed. **The Prokaryotes**, III, Springer. 2006. 1140p.

FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: COLLIER, L., BALOWS, A., SUSSMAN, N., EDWARD, A., ed. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9 ed., London, p. 669-682, 1997.

FACKLAM, R.R.; SAHM, D.F. & TEIXEIRA, L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, M.A.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C. & YOLKEN, R.H., ed. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed., Washington, ASM Press, p. 297-305, 1999.

FERREIRA, D. R. A. *et al.* Risk Factors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Captive *Sapajus* spp. **American Journal of Primates**, v. 77, n. 5, p. 558-562, may 2015.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R. *et al.* The Role and Application of Enterococci in Food and Health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1–24, 2006.

IUCN - International Union for Conservation of Nature. *Sapajus nigritus*. 2017. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/136717/0>>. Acesso em: 15 out. 2017.

JACKSON, C.R. *et al.* Prevalence, Species Distribution and Antimicrobial Resistance of *Enterococci* Isolated from Dogs and Cats in the United States. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1269–78, april 2009.

JIMÉNEZ, E. *et al.* Antibiotic Resistance, Virulence Determinants and Production of Biogenic Amines among *Enterococci* from Ovine, Feline, Canine, Porcine and Human Milk. **BMC Microbiology**, 13:288, december 2013, 12p.

JOHNSON, C. A. Nonhuman Primate Dental Care. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 2, p. 138-143, april 2008.

KE, D. *et al.* Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Enterococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3497-503, 1999.

KOMIYAMA, E. Y. *et al.* Enterococcus Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. **Plos One**, v. 11, n. 9, september 2016.

KÜHN I., *et al.* Comparison of Enterococcal Populations in Animals, Humans, and the Environment - a European Study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, v. 2-3, p. 133–145, 2003.

LEBRETON, F., WILLEMS, R. J. L., GILMORE, M. S. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. In: GILMORE, M. S., CLEWELL, D. B., IKE, Y., SHANKAR, N. (ed) **Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection (internet)**. Boston: Massachusetts eye and ear infirmary. 2014.

LEBRETON, F. *et al.* Emergence of Epidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* from Animal and Commensal Strains. **American Society of Microbiology**, v. 4, n. 4, July/August 2013.

LEITE-MARTINS, L. *et al.* Prevalence of Antimicrobial Resistance in Faecal *Enterococci* from Vet-Visiting Pets and Assessment of Risk Factors. **Veterinary Record**, v.176, 2015.

LEITE-MARTINS, L. *et al.* Spread of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* within the Household Setting. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, p. 501–507, 2014.

LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. **All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: List D – L**. 2017. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>>. Acesso em: 15 out. 2017.

MOREIRA, A. C. A. *et al.* Cocos Gram-Positivos Anaeróbios Estritos da Cavidade Oral e do Trato Intestinal de Primatas Calitriquídeos (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) mantidos em cativeiro. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 3, 2003.

POETA, P. *et al.* Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal *Enterococci* of Wild Animals in Portugal. **Journal Veterinary Medicine B Infectious Diseases Veterinary Public Health**, v. 52, n. 9, p. 396–402, 2005.

POETA, P. *et al.* Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Faecal *Enterococci* from Wild Boars (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 368–374, 2007.

SANTOS, T. *et al.* Dissemination of Antibiotic Resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from Wild Birds of Azores Archipelago. **Anaerobe**, v. 24, p. 25-31, 2013.

STEWART, J. R. *et al.* Survey of Antibiotic Resistant Bacteria Isolated from Bottlenose Dolphins *Tursiops Truncatus* in the Southeastern USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 108, n. 2, p. 91–102, 2014.

VILANOVA, R. *et al.* Limites Climáticos e Vegetacionais das Distribuições de *Cebus nigrurus* e *Cebus robustus* (Cebinae, Platyrrhini). **Neotropical Primates**, v. 13, n. 1, p. 14-19, 2005.

WERNER, G. *et al.* Antibiotic Resistant *Enterococci* - tales of a drug resistance gene trafficker. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 360-79, 2013.

WIGGS, B. R. & HALL, B. Nonhuman Primate Dentistry. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic animal practice**, v. 6, n. 3, p. 661-687, september 2003.

Wright, G. D. The Antibiotic Resistome: the Nexus of Chemical and Genetic Diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175–186, 2007.