

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

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.**

JANIRA PRICHULA  
Bióloga – UFRGS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Março de 2015

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

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.**

JANIRA PRICHULA  
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Molecular de Procariotos.

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Março de 2015

Prichula, Janira

Caracterização fenotípica e genotípica de Enterococcus spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. / Janira Prichula. -- 2015. 152 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Enterococcus spp. . 2. pinguins-de-magalhães . 3. resistência antimicrobiana. 4. fatores de virulência. 5. diversidade genética. I. Guedes Frazzon, Ana Paula, orient. II. Título.

JANIRA PRICHULA  
BIOLÓGA  
UFRGS

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
Para obtenção do Grau de

## MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

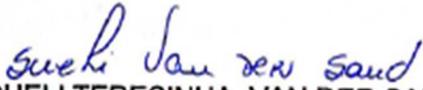
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 30 / 03 / 2015  
Pela Banca Examinadora

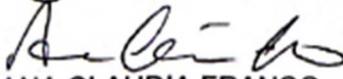
Homologado em: 12 / 08 / 2015  
Por:

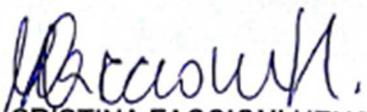
  
ANA PAULA GUEDES FRAZZON  
Orientador-UFRGS

  
SUELI TERESINHA VAN DER SAND  
Coordenadora do PPGMAA

  
JEVERSON FRAZZON  
UFRGS

  
JULIANA CAIRÃO  
UFSCPA

  
ANA CLAUDIA FRANCO  
UFRGS

  
MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER  
Diretora do ICBS - UFRGS

Dedico esta Dissertação à minha mãe, por me ensinar o quanto a busca do conhecimento é essencial e pelos constantes apoio e carinho, fundamentais na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ana Paula Guedes Frazzon**, pela excelente orientação, pela vivência agradável, pelo carinho, pelo incentivo, por dedicar seu tempo a me ensinar, enfim, por todos os aprendizados que contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

Ao biólogo **Maurício Tavares**, do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) do Instituto de Biociências da UFRGS, pelos inúmeros aprendizados sobre a vida marinha e por colaborar com as coletas das amostras avaliadas neste estudo.

Aos membros da Banca Examinadora, **Ana Cláudia Franco**, **Juliana Caierão** e **Jeverson Frazzon**, pela disponibilidade e pela colaboração, aceitando o convite para fazer parte da Banca deste trabalho.

Ao Prof. **Pedro d’Azevedo**, pela oportunidade de fazer parte de um grupo tão rico em recursos intelectuais e afetivos como o grupo do Laboratório de Cocos Gram-positivos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Em especial, aos colegas de laboratório da UFCSPA, **Bruna Batista**, **Gabriela Cunha**, **Gustavo Sambrano**, **Mariana Mott**, **Renata Soares**, **Thiago Paim**, pela ajuda e pela amizade, pelas boas risadas e pelos momentos de descontração, que tornaram este período de qualificação profissional mais divertido e enriquecedor.

Às minhas colegas de trabalho da UFCSPA, **Ana Maris Carlesso**, **Andréia Duprat** e **Rebeca Inhoque**, pelo apoio nos momentos de ausência no trabalho devido a experimentos e disciplinas do Mestrado. Em especial, à amiga Rebeca Inhoque, por ser “meu braço direito” no trabalho, por me incentivar e apoiar nos momentos de cansaço e dificuldades, bem como pelos momentos agradáveis de troca, sugestões, carinho e muitas risadas todos os dias.

À amiga **Marília Zandoná**, pela confiança, pelo apoio e pelos inúmeros aprendizados de Microbiologia no início da minha formação

profissional e, principalmente, pela amizade compartilhada ao longo desses anos.

Aos meus estagiários, **Guilherme Raffo** e **Leonardo Almansa**, pela competência, pelo comprometimento e pela responsabilidade que demonstraram ao longo do desenvolvimento deste trabalho de Mestrado. Agradeço também pelos inúmeros bons momentos de descontração, amizade e carinho que tornaram nosso convívio em grupo harmonioso e produtivo.

À amiga **Naiara Santestevan**, pela amizade única que construímos ao longo do período acadêmico e por todos os bons e maus momentos que compartilhamos juntas ao longo desta etapa de qualificação profissional.

Aos meus tios, **Egídio**, **Mira** e **Zeneide**, por me acolherem em seus lares quando vim para Porto Alegre para estudar, por apoiarem todas as minhas escolhas, dando o suporte financeiro e afetivo necessário, o que possibilitou que eu conseguisse realizar meus estudos e trilhar meu caminho, mais tarde, de maneira independente.

Ao meu namorado, **Fernando Bueno**, pelo companheirismo, pela paciência e pelo amor dedicado sempre.

À minha família, em especial, à minha **mãe** e à minha amada irmã, **Jacira Prichula**, pelo apoio e pela atenção em todos os momentos de minha vida.

Muito obrigada!

“A natureza deve ser compreendida como um todo, mas deve ser estudada em detalhe.”

Mario Bunge

## **Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.**

Autor: Janira Prichula<sup>1</sup>

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

### **RESUMO**

Os *Enterococcus* spp. apresentam uma natureza ubiquitária que lhes permite sobreviver em diversos nichos ecológicos. Estudos envolvendo enterococos isolados de animais marinhos são escassos. Em razão disso, este trabalho teve como objetivo isolar, identificar, avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, a presença de fatores de virulência e a diversidade genética de enterococos isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. No total, 172 enterococos foram isolados e identificados como *E. faecalis* (43%), *E. faecium* (33,7%), *E. hirae* (12,8%) e *E. mundtii* (10,5%). Cento e quatorze isolados foram sensíveis aos dez antimicrobianos testados. Fenótipos de resistência foram encontrados para ciprofloxacina (28,5%), eritromicina (25%), norfloxacina (14,5%) e tetraciclina (4,6%). Todos os isolados resistentes à tetraciclina apresentavam o gene *tet*(M) e apenas dois não apresentaram o *tet*(L). O gene *erm*(B) não foi detectado nos resistentes à eritromicina. Genes de virulência, *gelE* e *ace* (43%) e *asa* (35,5%) foram detectados nos *E. faecalis*. A atividade de gelatinase foi verificada em 64 isolados. A maioria dos enterococos foi fraco formador de biofilme. A análise dos perfis gerados por PFGE revelou um grande número de clones. Em conclusão, os enterococos compõem a microbiota do trato gastrintestinal dos pinguins-de-magalhães e a detecção de determinantes de resistência e virulência indica que os enterococos podem constituir um reservatório de tais características e, sendo o ambiente marinho um meio de disseminação, é importante considerar o potencial deste gênero em ocasionar riscos à saúde desses animais e à do ecossistema marinho.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (152 p.). Março, 2015.

**Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. from fecal samples of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the North coast of Rio Grande do Sul, Brazil.**

Author: Janira Prichula<sup>1</sup>

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

**ABSTRACT**

*Enterococcus* spp. shows a ubiquitous nature that enables survival in different ecological niches. Studies involving enterococci isolated from marine animals are scarce. For this reason, this study aimed to isolate, identify, evaluate the antimicrobial susceptibility profile, the presence of virulence factors and the genetic diversity of enterococci isolated from fecal samples of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) found in the North coast of Rio Grande do Sul, Brazil. Overall, 172 enterococci were isolated and identified as *E. faecalis* (43%) *E. faecium* (33.7%), *E. hirae* (12.8 %) and *E. mundtii* (10.5%). One hundred and fourteen isolates were susceptible to the ten tested antimicrobials. Resistance phenotypes were found for ciprofloxacin (28.5%), erythromycin (25%), norfloxacin (14.5%) and tetracycline (4.6%). The tetracycline resistant isolates showed the *tet(M)* gene and only two isolates didn't present *tet(L)*. The *erm(B)* gene wasn't detected in erythromycin resistant isolates. Virulence genes, *gelE/ ace* genes (43%) and *asa* (35.5%) were found only in *E. faecalis*. The gelatinase activity was observed in 64 strains. The majority of enterococci were weak biofilm formers. The analysis of the profiles generated by PFGE has revealed a large number of clones. In conclusion, enterococci compose the microbiota of magellanic penguins and the detection of resistance and virulence determinants indicates that enterococci may constitute a reservoir of such characteristics and, as the marine environment is a way of dissemination, it is important to consider the potential of this genus in cause health risks of these animals and the marine ecosystem.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (152 p.). March, 2015.

## SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS .....	xi	
RELAÇÃO DE FIGURAS .....	xiii	
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.2	Objetivos .....	4
1.2.1	Objetivo geral .....	4
1.2.2	Objetivos específicos .....	4
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
2.1	As aves marinhas e a sua relação com o ambiente costeiro do Rio Grande do Sul.....	6
2.2	Família Spheniscidae .....	8
2.3	<i>Spheniscus magellanicus</i> (Forster, 1781) .....	10
2.4	O gênero <i>Enterococcus</i> spp.....	17
2.4.1	Taxonomia.....	17
2.4.2	Caracterização do gênero <i>Enterococcus</i> spp.....	19
2.4.3	Ecologia dos <i>Enterococcus</i> spp. ....	21
2.4.4	Resistência antimicrobiana.....	29
2.4.5	$\beta$ -lactâmicos .....	30
2.4.6	Aminoglicosídeos .....	31
2.4.7	Glicopeptídeos .....	32
2.4.8	Macrolídeos.....	33
2.4.9	Quinolonas .....	34
2.4.10	Cloranfenicol .....	35
2.4.11	Nitrofurantoína.....	35
2.4.12	Tetraciclina .....	36
2.4.13	Genes de virulência.....	37
2.4.14	Citolisina.....	38
2.4.15	Gelatinase .....	38
2.4.16	Adesina de colágeno.....	39
2.4.17	Substância de agregação.....	39
2.4.18	Biofilmes.....	40
2.4.19	PFGE ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> ).....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
3.1	Amostras .....	45
3.2	Coleta das amostras .....	46
3.3	Processamento das amostras: seleção e isolamento de enterococos.....	47

3.4	Hidrólise da esculina na presença de sais biliares .....	48
3.5	Produção da enzima catalase .....	48
3.6	Análise microscópica das células bacterianas .....	49
3.7	Preservação dos isolados bacterianos .....	49
3.8	Extração do DNA bacteriano .....	50
3.9	Confirmação do gênero <i>Enterococcus</i> por PCR.....	50
3.10	Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. por PCR convencional .....	51
3.11	Caracterização fenotípica de isolados não identificados.....	53
3.12	Fermentação de carboidratos.....	54
3.13	Utilização do piruvato de sódio.....	55
3.14	Hidrólise da arginina.....	55
3.15	Tolerância ao telurito de potássio.....	56
3.16	Produção de pigmento .....	56
3.17	Motilidade .....	57
3.18	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	57
3.19	Detecção dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i> relacionados à resistência bacteriana, à tetraciclina e à eritromicina .....	58
3.20	Detecção de genes de virulência <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i> .....	60
3.21	Detecção da enzima gelatinase .....	61
3.22	Avaliação da capacidade de formação de biofilme .....	62
3.23	Cálculo para determinação do grau de formação do biofilme .....	63
3.24	Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
4.1	<i>Enterococcus</i> spp. isolados a partir de amostras fecais de pinguins-de-magalhães .....	67
4.2	Confirmação do gênero pela detecção do gene <i>tuf</i> .....	71
4.3	Identificação das espécies por meio de testes fisiológicos e PCR convencional.....	72
4.4	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	79
4.5	Presença dos genes <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>erm(B)</i> relacionados à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina .....	85
4.6	Detecção de genes de virulência por PCR.....	88
4.7	Relação entre a presença do gene <i>gelE</i> e a produção da enzima gelatinase .....	92
4.8	Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	93
4.9	Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	98
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>136</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Gêneros, espécies, nomes populares e categorias de risco das espécies de pinguins (Spheniscidae) ameaçadas segundo a lista vermelha da IUCN (2015) .....	9
TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico ( <i>tuf</i> ). .....	50
TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR espécie-específicos ( <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. gallinarum</i> e <i>E. mundtii</i> ), temperatura de anelamento e tamanhos dos fragmentos gerados. ....	52
TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> e <i>erm(B)</i> .....	59
TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados para <i>cylA</i> (citolisina), <i>gelE</i> (gelatinase), <i>ace</i> (adesina de colágeno) e <i>asa</i> (substância de agregação). ....	60
TABELA 6. Informações referentes às amostras utilizadas no estudo.....	71
TABELA 7. Perfil fisiológico atípico dos enterococos não identificados por PCR pertencentes às amostras P1 e P7.....	73
TABELA 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de pinguins-de-magalhães ( <i>Spheniscus magellanicus</i> ) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	80
TABELA 9. Presença e ausência dos genes <i>tet(M)</i> e <i>tet(L)</i> em enterococos resistentes à tetraciclina isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães ( <i>Spheniscus magellanicus</i> ) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. ....	86
TABELA 10. Genes de virulência <i>cylA</i> , <i>gelE</i> , <i>ace</i> e <i>asa</i> encontrados nas diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães ( <i>Spheniscus magellanicus</i> ) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. ....	89
TABELA 11. Relação entre a presença do gene <i>gelE</i> e a atividade gelatinolítica entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães ( <i>Spheniscus magellanicus</i> ) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. ....	92

TABELA 12. Capacidade de formação de biofilme das diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães ( <i>Spheniscus magellanicus</i> ) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....	94
---	----

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1. Exemplar adulto de *Spheniscus magellanicus*. ..... 11
- FIGURA 2. Locais e áreas de cobertura das instituições que relataram a ocorrência de pinguins-de-magalhães. ....13
- FIGURA 3. Distribuição de espécies do gênero *Enterococcus* na natureza. O dendrograma mostra as relações filogenéticas. As fontes de isolamento são indicadas para cada espécie. A cadeia alimentar é mostrada simplificadamente. Símbolos vermelhos e pretos indicam aquelas espécies que têm sido descritas em infecções humanas ou de colonização, respectivamente.....23
- FIGURA 4. Dois exemplares de pinguins pertencentes à espécie *Spheniscus magellanicus* encontrados durante os monitoramentos nas praias de Cidreira e Capão da Canoa, respectivamente, no Litoral Norte do Rio Grande do Sul; (a) amostra P6 (3267) e (b) amostra P9 (AM 687).. ....68
- FIGURA 5. Fragmentos de DNA de 112 pares de base, correspondente ao gene *tuf* amplificado pela reação de PCR, em gel de agarose 1,5%. Controles: (C+) *E. faecium* SS1274, (C+) *E. faecalis* ATCC 29212 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular 100 pb. ....72
- FIGURA 6. Fragmentos de DNA de 98 pb, 180 pb, 475 pb e 658 pb, correspondentes às espécies *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente, amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1,5%. Controles: (C+) *E. mundtii* J5 (C+) *E. hirae* C10, (C+) *E. faecalis* ATCC 29212, (C+) *E. faecium* SS1274 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular de 100 pb.....74
- FIGURA 7. Distribuição de espécies de enterococos da microbiota intestinal de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.....75
- FIGURA 8. Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *Sma*I, dos enterococos isolados das amostras P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9.....99
- FIGURA 9. Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, dos isolados de *E. hirae* da amostra P1.....101

FIGURA 10: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, dos isolados de *E. mundtii* da amostra P7..... 102

FIGURA 11. Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de resistência *erm(B)*, *tet(M)* e *tet(L)*, dos isolados de *E. faecium* das amostras P3, P4 e P6..... 103

FIGURA 12. Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, genes de virulência (*cylA*, *asa*, *ace*, *geE*), produção de gelatinase (G) e capacidade de formação de biofilme, dos isolados de *E. faecalis* das amostras P2, P5, P8 e P9..... 105

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>µg:</b>	microgramas
<b>µL:</b>	microlitro
<b>µM:</b>	micromolar
<b>Ace:</b>	adesina de colágeno
<b>Agg:</b>	substância de agregação
<b>AMP:</b>	ampicilina
<b>ARA:</b>	arabinose
<b>ARG:</b>	arginina
<b>ATCC:</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CDC:</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CECLIMAR:</b>	Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos
<b>CEMAVE:</b>	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
<b>CERAM:</b>	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos
<b>CETAS:</b>	Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina
<b>CIP:</b>	ciprofloxacina
<b>CLO:</b>	cloranfenicol
<b>CLSI:</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CRAM:</b>	Centro de Recuperação de Animais Marinhos
<b>dNTP:</b>	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>EDTA:</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ERI:</b>	eritromicina
<b>Esp:</b>	proteína de superfície de <i>Enterococcus</i>
<b>EST:</b>	estreptomicina
<b>GeI:</b>	enzima gelatinase
<b>GEN:</b>	gentamicina
<b>ICMBio:</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<b>IUCN:</b>	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
<b>LAB:</b>	bactérias ácido-láticas
<b>MAN:</b>	manitol
<b>MGP:</b>	metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
<b>MLST:</b>	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
<b>MLVA:</b>	<i>Multiple-locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis</i>
<b>mM:</b>	milimolar
<b>MOT:</b>	motilidade
<b>ng:</b>	nanogramas
<b>NIT:</b>	nitrofurantoína
<b>NOR:</b>	norfloxacina
<b>PBP:</b>	proteína de ligação de penicilinas
<b>PCR:</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE:</b>	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
<b>PIG:</b>	pigmento
<b>PIR:</b>	piruvato
<b>PYR:</b>	L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida
<b>RAF:</b>	rafinose
<b>RAPD:</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>

<b>rRNA:</b>	ácido ribonucleico ribossomal
<b>SAC:</b>	sacarose
<b>SBL:</b>	sorbitol
<b>SOR:</b>	sorbose
<b>Taq:</b>	enzima polimerase extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE:</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>TEL:</b>	telurito
<b>TET:</b>	tetraciclina
<b>VAN:</b>	vancomicina
<b>VRE:</b>	<i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>

## 1 INTRODUÇÃO

A Zona Costeira do Brasil apresenta um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental que abriga inúmeras espécies de flora e fauna, endêmicas e exóticas. Nessa faixa litorânea está inserido o litoral do Rio Grande do Sul (RS), onde ocorre o encontro de duas correntes marítimas importantes, fato que contribui para o estabelecimento de uma grande riqueza biológica de espécies marinhas na região.

A Corrente das Malvinas (corrente fria) e a Corrente do Brasil (corrente quente) formam, na zona costeira do RS, a chamada Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul Ocidental. Caracterizada por uma massa d'água rica em nutrientes, essa zona atrai uma grande diversidade de animais marinhos e diversas aves migratórias que exploram a oferta abundante de alimentos na região. Entre essas aves, estão os pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), uma das espécies mais frequentemente encontradas no Litoral Norte do RS.

No contexto atual, os pinguins-de-magalhães enfrentam sérias ameaças e encontram-se em declínio populacional. Os dados referentes a ocorrência, biologia e ecologia desses animais são oriundos de centros que atuam realizando monitoramento, resgate e reabilitação nas regiões costeiras.

Os animais debilitados ou com sérios problemas de saúde são levados a esses centros de reabilitação e, na maioria dos casos, são soltos na natureza após um período de recuperação. Entretanto, alguns animais não conseguem se recuperar e necessitam de cuidados permanentes, sendo mantidos em cativeiro pelo resto de suas vidas.

Alguns fatores podem afetar negativamente a sobrevivência desses animais, tais como o desenvolvimento desordenado das regiões costeiras e o tráfego e acidentes de embarcações marinhas. Essas atividades podem contribuir para o declínio ou o desaparecimento de recursos naturais e também gerar um aumento na exposição dos animais a diversos poluentes. Desse modo, o ambiente marinho pode servir como via de disseminação de poluentes químicos (óleos e compostos organopersistentes) provenientes de outros ambientes que afetam diretamente a biodiversidade. Outro risco é a disseminação de micro-organismos alóctones (vírus, protozoários e bactérias) que podem ser carreadores de traços de virulência adquiridos em outros ambientes seletivos e com potencial patogenicidade para seres humanos e animais marinhos, tais como os pinguins.

O gênero *Enterococcus* apresenta uma natureza ubiquitária que lhe permite sobreviver em diversos nichos ecológicos. O gênero inclui, segundo evidências filogenéticas e moleculares, mais de 50 espécies que são frequentemente isoladas de fontes como solo, água, plantas, alimentos, ao passo que em seres humanos e outros animais são considerados comensais da microbiota da cavidade oral, trato geniturinário e gastrointestinal.

Os enterococos são reconhecidos pela capacidade intrínseca que apresentam de portar, adquirir e transferir genes de resistência aos antimicrobianos e/ou de virulência, o que lhes confere vantagens seletivas de sobrevivência e disseminação no ambiente como um todo. Diante disso, os enterococos são um grupo de bactérias com importância clínica e ambiental, os quais já tiveram sua presença investigada e monitorada em diferentes habitats, fornecendo importantes informações a respeito das interações e distúrbios ambientais.

Mais recentemente, o ecossistema marinho tem sido alvo de estudos envolvendo enterococos, por ser um ambiente ainda pouco explorado e apresentar grande potencial de abrigar novas espécies bacterianas. Entretanto, grande parte dos estudos ainda é motivada pela atenção dada aos enterococos como possíveis indicadores da qualidade de águas. Há poucos trabalhos envolvendo enterococos e animais marinhos na natureza, principalmente, devido aos hábitos migratórios de algumas espécies marinhas e pela dificuldade em se obter amostras desses ambientes.

Estudos com animais marinhos podem fornecer subsídios para ações futuras visando tanto a sua proteção como a do ambiente marinho. A relevância em investigar o gênero enterococos está no fato que eles são componentes da microbiota de uma série de animais, tendo influência direta em sua saúde e ecologia.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Isolar, identificar, avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, detectar a presença de fatores de virulência e analisar a diversidade genética de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- ❖ Isolar bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* a partir de suabes contendo amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul;
- ❖ Confirmar o gênero bacteriano por PCR empregando os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos para o gene *tuf*;
- ❖ Identificar as espécies por meio de testes bioquímicos convencionais e técnicas moleculares, empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos;
- ❖ Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e os mecanismos genéticos de resistência envolvidos;
- ❖ Verificar a presença dos genes *ace*, *gelE*, *cyIA* e *asa*, envolvidos na virulência de enterococos, e relacionar a presença do gene *gelE* com sua expressão fenotípica de gelatinase;

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

❖ Analisar a diversidade genética dos enterococos por meio de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, utilizando a técnica da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 As aves marinhas e a sua relação com o ambiente costeiro do Rio Grande do Sul**

A Zona Costeira do Brasil abriga um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental, cuja diversidade é marcada pela transição entre ambientes terrestres e marinhos. As águas frias do sul e do sudeste e as águas quentes do norte e do nordeste dão suporte a uma variedade de ecossistemas que abrigam inúmeras espécies de flora e fauna, endêmicas e exóticas, entre os quais se destacam: manguezais, recifes de corais, dunas, restingas, praias arenosas, costões rochosos, lagoas, estuários e marismas (Brasil, 2015).

A região litorânea brasileira se estende por mais de 8.500 quilômetros, abrangendo 17 estados e mais de 400 municípios, na sua porção terrestre, distribuídos do norte equatorial ao sul temperado do país. Compreende, ainda, uma faixa marítima formada por mar territorial, com largura de 12 milhas náuticas a partir da linha da costa que tem início na região costeira e inclui a plataforma continental marinha e a Zona Econômica Exclusiva (alonga-se até 200 milhas da costa). Dessa forma, o Brasil possui uma das maiores faixas costeiras do mundo, da foz do rio Oiapoque, no Amapá, até o Chuí, no Rio Grande do Sul (Brasil, 2015).

No estado do Rio Grande do Sul (RS), a região costeira se estende no sentido norte-sul por cerca de 620 quilômetros de costa retilínea. A zona costeira é dividida em quatro grandes setores: Litoral Norte (do município de Torres até o município de Cidreira), Litoral Médio Leste (de Palmares do Sul até São José do Norte), Litoral Médio Oeste (de Barra do Ribeiro até Pelotas) e Litoral Sul (do município de Rio Grande até Santa Vitória do Palmar) (FEPAM, 2015).

O litoral do RS apresenta uma grande riqueza biológica de espécies marinhas, e isso se deve, principalmente, ao encontro de duas correntes marítimas importantes. A Corrente das Malvinas (corrente fria) e a Corrente do Brasil (corrente quente) formam, nessa região, a chamada Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul Ocidental (CECLIMAR, 2015). Parte da água fria vinda do sul afunda e ocupa a camada inferior da Corrente do Brasil, ao longo da talude continental, e dá origem a uma massa d'água rica em nutrientes com baixas temperaturas e salinidade. Além disso, o mar associa-se a ambientes estuarinos e a diversos sangradouros, o que aumenta o aporte nutricional da zona de varrido e atrai grande diversidade de animais marinhos (Mader, 2010).

A região costeira do RS possui áreas de importância internacional para aves costeiras e marinhas, residentes ou migratórias, sendo considerada uma região de importância extrema em relação às necessidades de conservação da diversidade biológica. A região abriga um Sítio Ramsar (o Parque Nacional da Lagoa do Peixe) e diversas áreas incluídas na Reserva da Biosfera (Mader, 2010). Vários estudos salientam a relevância dos ambientes

costeiros para o ciclo biológico de diversas aves marinhas (Marini & Garcia, 2005; Mader et al., 2010; Michels-Souza et al., 2010; Ruoppolo et al., 2012; Silva, 2013).

As aves marinhas são um grupo diversificado de espécies que se adaptaram de maneira eficiente a ambientes costeiros e oceânicos, como forma de aproveitar os recursos disponíveis nesses ecossistemas (Branco et al., 2010). Esse grupo é formado por cerca de 328 espécies agrupadas em quatro ordens: Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelecaniformes, Charadriiformes (Harmer et al., 2002). No Brasil, ocorrem cerca de 150 espécies de aves marinhas; contudo, apenas 18 podem ser encontradas nidificando no país (Branco et al., 2010). No inverno, quando há maior influência da Corrente das Malvinas, muitas aves marinhas acabam aparecendo no litoral do RS, e entre essas aves estão os pinguins-de-magalhães, uma das espécies mais frequentemente encontradas no litoral gaúcho (CECLIMAR, 2015).

## **2.2 Família Spheniscidae**

A família Spheniscidae (Ordem: Sphenisciformes) é conhecida como a família dos “pinguins”. Essa família é constituída por 6 gêneros e 18 espécies de aves marinhas que não voam, conforme descritas na Tabela 1. As colônias dessas aves são encontradas na Antártica, nas Ilhas de Galápagos, na África do Sul, na Austrália, na Nova Zelândia e na América do Sul. A maioria das espécies está globalmente ameaçada, de acordo com a lista vermelha da

União Internacional pela Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais – IUCN, sendo consideradas espécies vulneráveis ou em perigo de extinção (Birdlife, 2015; IUCN, 2015).

TABELA 1: Gêneros, espécies, nomes populares e categorias de risco das espécies de pinguins (Spheniscidae) ameaçadas segundo a lista vermelha da IUCN (2015).

Gêneros	Espécies	Nomes populares	Categorias de risco
<b>Aptenodytes spp.</b>	<i>A. forsteri</i>	pinguim-imperador	NT
	<i>A. patagonicus</i>	pinguim-rei	LC
<b>Eudyptes spp.</b>	<i>E. chrysocome</i>	pinguim-de-penacho-amarelo	VU
	<i>E. chrysolophus</i>	pinguim-de-testa-amarela	VU
	<i>E. moseleyi</i>	pinguim-de-penacho-amarelo-norte	EM
	<i>E. pachyrhynchus</i>	pinguim-de-fiordland	VU
	<i>E. robustus</i>	pinguim-de-snares	VU
	<i>E. schlegeli</i>	pinguim-real	VU
	<i>E. sclateri</i>	pinguim-da-crista-ereta	EM
<b>Eudyptula spp.</b>	<i>E. minor</i>	pinguim-pequeno	LC
<b>Megadyptes spp.</b>	<i>M. antipodes</i>	pinguim-do-olho-amarelo	EM
<b>Pygoscelis spp.</b>	<i>P. adeliae</i>	pinguim-de-adélia	NT
	<i>P. antarcticus</i>	pinguim-de-barbicha	LC
	<i>P. papua</i>	pinguim-gentoo	NT
<b>Spheniscus spp.</b>	<i>S. demersus</i>	pinguim-africano	EM
	<i>S. humboldti</i>	pinguim-humboldt	VU
	<i>S. mendiculus</i>	pinguim-de-galápagos	EM
	<i>S. magellanicus</i>	pinguim-de-magalhães	NT

EN: "Endangered" – em perigo de extinção

VU: "Vulnerable" – vulnerável

NT: "Near Threatened" – quase ameaçado

LC: "Least Concern" – menos preocupante

O gênero *Spheniscus* é constituído por quatro espécies, sendo que três delas (*S. humboldti*, *S. mendiculus* e *S. magellanicus*) ocorrem na América do Sul e uma (*S. demersus*) ocorre no Continente Africano (Waller, 2011). No litoral sul do Brasil, há registro de ocorrência de quatro espécies de pinguins, o pinguim-rei (*A. patagonicus*), o pinguim-de-penacho-amarelo (*E. chrysocome*), o pinguim-de-testa-amarela (*E. chrysolophus*) e o pinguim-de-magalhães (*S. magellanicus*), sendo esta última a espécie encontrada com maior frequência no Litoral Norte do RS (Bencke et al., 2010; CECLIMAR, 2015).

### **2.3 *Spheniscus magellanicus* (Forster, 1781)**

O pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* – Forster, 1781) é uma espécie nativa do sul da América do Sul, onde se reproduz em numerosas colônias distribuídas pela Argentina, Chile e Ilhas Falkland (Malvinas). Anualmente, ocorrem movimentos migratórios sazonais desse grupo para o Brasil e para o Uruguai à procura de alimento. Além disso, já foram encontrados em El Salvador, na Antártica, na Austrália e na Nova Zelândia (Birdlife, 2015). A população mundial dessa espécie está diminuindo e, atualmente, é estimada em cerca de 1,3 milhão de pares reprodutores, sendo considerada quase ameaçada (IUCN, 2015).

Os pinguins-de-magalhães são aves pelágicas que podem permanecer no mar por vários meses. Entre suas diversas adaptações para o nado e o mergulho estão os membros torácicos modificados em nadadeiras, glândulas nasais bem desenvolvidas para excreção do cloreto de sódio, pés com membranas interdigitais que atuam como leme, ossos densos (não pneumáticos) e corpo fusiforme. Além disso, apresentam penas modificadas, que são achatadas e uniformes em seu tamanho por todo o corpo, que aprisionam uma camada de ar na superfície do animal, ajudando a minimizar a perda de calor para o meio externo (Harmer et al., 2002; Coraiola, 2012; CECLIMAR, 2015).

Uma característica marcante dessa espécie de pinguim é a faixa branca formada na região dos olhos e que se estende até o pescoço do animal quando adulto. A sua plumagem é negra nas costas e nas asas e branca na zona ventral e no pescoço. Os olhos, o bico e as patas são negros (conforme

Figura 1). Os animais jovens apresentam plumagem acinzentada e sem definição de listras características da espécie. Quando adultos, medem cerca de 70 cm e podem pesar até 5 kg. Não há um dimorfismo sexual marcante na espécie; porém, os machos costumam ser mais robustos que as fêmeas. A maturidade sexual das fêmeas é alcançada entre 4 e 5 anos e a dos machos, entre 6 e 7 anos (Reis et al., 2011; Vanstreels et al., 2011, Vanstreels et al., 2012; CECLIMAR, 2015).

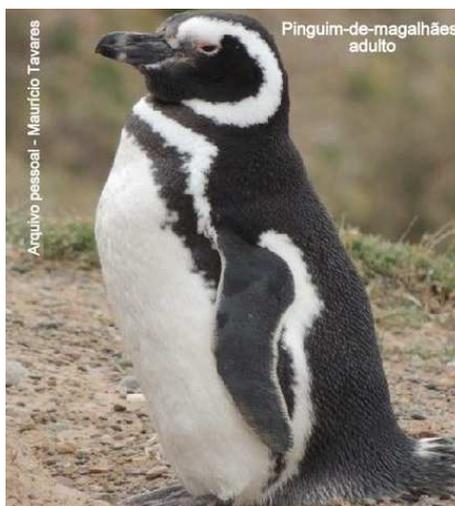


FIGURA 1. Exemplar adulto de *Spheniscus magellanicus*. Fonte: Arquivo pessoal de Maurício Tavares (CECLIMAR, 2015).

Durante o período reprodutivo, os pinguins retornam às colônias para postura e incubação de seus ovos. As aves nidificam no solo ou em arbustos, geralmente em tocas escondidas sob a vegetação (raramente a céu aberto para evitar a predação e a exposição ao sol dos ovos), sendo que comumente ocorre a postura de dois ovos. Os pinguins-de-magalhães são monogâmicos, o macho e a fêmea constroem e cuidam do ninho e dos filhotes (Stokes & Boersma, 1998; Yorio et al., 2001, Boersma, 2008). Com cerca de 3

meses de idade, os filhotes com a plumagem juvenil completa e estatura próxima à dos adultos saem do ninho e seguem para o mar sem o acompanhamento dos pais. Apenas no final do primeiro ano de vida os filhotes mudam para a plumagem adulta (Coraiola, 2012; Vanstreels et al., 2012).

A dieta desses animais é composta por uma grande variedade de peixes, crustáceos e moluscos (Fonseca et al., 2001; Pinto et al., 2007; Baldassin et al., 2010). Durante sua permanência nas colônias para reprodução e troca de plumagem, os pinguins passam por períodos prolongados sem se alimentar. Antes de se submeterem a este jejum anual, os pinguins acumulam grandes reservas de tecido adiposo branco e proteínas, sendo capazes inclusive de armazenar uma quantidade abundante de alimento não digerido no estômago. Esse alimento estocado é utilizado, posteriormente, para a sua própria nutrição e a de seus filhotes. Além disso, os alimentos estocados fornecem energia para a síntese de penas e para manutenção do metabolismo no período da muda. Durante esse período, por causa das consequências de redução da impermeabilização e do isolamento térmico, os pinguins não podem retornar ao mar para se alimentar (Dewar, 2012).

Após o período reprodutivo e a troca de plumagem, no final de fevereiro, os animais jovens e adultos saem de suas colônias e realizam longas migrações em busca de alimento. Entre os meses de março e setembro, com a chegada do inverno, há maior influência da Corrente das Malvinas e, em decorrência disso, essas aves são abundantes na plataforma continental do sul do Brasil e do Uruguai (Putz et al., 2007; CECLIMAR, 2015). Estudos

demonstram que esses animais podem chegar até o nordeste do Brasil (Dantas et al., 2013).

Entre os principais centros de informações e cuidados com pinguins-de-magalhães na região sul do Brasil, destacam-se o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM, Museu Oceanográfico da Fundação Universidade Federal do Rio Grande) e o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR, vinculado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) no Rio Grande do Sul. No estado de Santa Catarina, há o Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina (CETAS, Polícia Militar Ambiental e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, em parceria com a R3 Animal), conforme Figura 2.

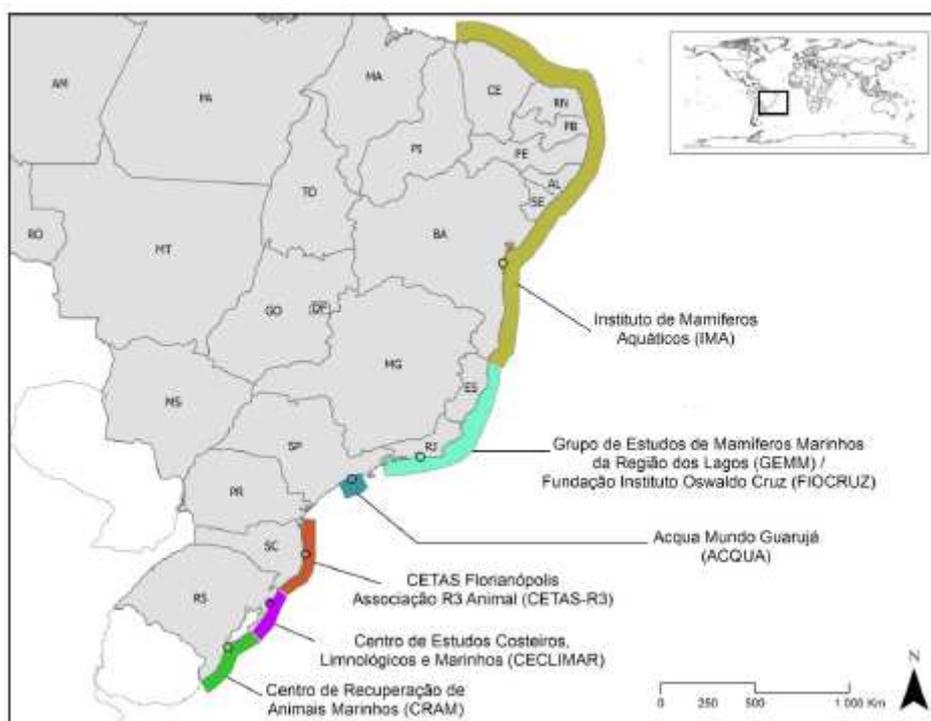


FIGURA 2. Locais e áreas de cobertura das instituições que relataram a ocorrência de pinguins-de-magalhães. Fonte: Adaptado de Dantas et al. (2013).

Além do acompanhamento periódico desses centros, chamadas realizadas pela população contribuem para que animais avistados fora da rotina dos monitoramentos sejam amparados. A maioria dos estados brasileiros tem sua costa monitorada. No entanto, em virtude da falta de esforços ou de áreas de difícil acesso, ainda existem regiões sem cobertura (Dantas et al., 2013; CECLIMAR, 2015).

Apesar de a reabilitação realizada nesses centros ser efetiva, não há unificação dos procedimentos adotados. Muitas informações sobre os aspectos clínicos, laboratoriais, de dieta e rotas migratórias, por exemplo, têm sido perdidas com a falta de metodologias adequadas e de coletas sistemáticas de caráter científico (Cariolato, 2012; Dantas et al., 2013). Visando minimizar esse problema, em 2010, foi criado o “Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães”, pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE – ICMBio), em parceria com pesquisadores da área. O Projeto tem como objetivos ampliar o conhecimento sobre a espécie no Brasil e otimizar os esforços de monitoramento, reabilitação e pesquisa, possibilitando a contribuição e a integração de iniciativas em prol da conservação (ICMBio, 2015).

Existem poucos estudos incluindo hematologia, bioquímica clínica, microbiologia e toxicologia em pinguins-de-magalhães. Essas informações são necessárias para o conhecimento do estado geral desses animais e para decisões sobre manutenção, reabilitação ou soltura (Cariolato, 2012). Além disso, essas análises podem gerar informações importantes sobre impactos sofridos por essas aves a longo prazo, uma vez que elas são excelentes

indicadoras da qualidade ambiental dos oceanos (Boersma, 2008; Mader et al., 2010; Vanstreels et al., 2011; Silva, 2013). A grande incidência de material antrópico ingerido pelos pinguins-de-magalhães reflete a poluição dos oceanos em diferentes regiões ao longo da distribuição da espécie e traz preocupações a respeito da sua conservação (Silva, 2013).

É importante destacar que o desenvolvimento das regiões costeiras, o tráfego e acidentes com embarcações marinhas podem contribuir para o declínio dos recursos naturais e para aumentar a exposição a substâncias tóxicas que podem afetar negativamente a sobrevivência desses animais. A contaminação das águas marinhas pode ocorrer a partir de uma variedade de fontes, por meio de poluentes químicos oriundos de óleos e derivados, compostos organopersistentes, metais pesados, escoamento de resíduos da agricultura, bem como por meio da exposição a agentes biológicos patogênicos (bactérias, vírus e protozoários) provenientes, principalmente, do despejo de esgotos residenciais, industriais e hospitalares. Essas diferentes formas de poluição podem influenciar na saúde dos pinguins-de-magalhães (Yorio & Boersma, 1992; García-Borboroglu et al., 2006; Boersma, 2008; Diaz et al., 2010; Mader et al., 2010; Michels-Souza et al., 2010; Ruoppolo et al., 2012). Desse modo, o sistema aquoso funciona como uma via de transporte de poluentes químicos e microbiológicos, carreadores de traços adquiridos em outros ambientes seletivos e com potencial patogenicidade para seres humanos e outros animais, como os pinguins (Stewart et al., 2014).

A maior parte dos estudos sobre patógenos que colonizam aves é realizada com aves de cativeiro, em que há interesse da indústria alimentícia

em minimizar as perdas devido a doenças de origem bacteriana. São poucos os estudos sobre patógenos que colonizam aves marinhas na natureza, principalmente, devido aos hábitos migratórios de algumas espécies e pela dificuldade em se obterem amostras (Fix et al., 1988; Diaz et al., 2010; Campos et al., 2013; Niemeyer et al., 2013; Osório et al., 2013).

Na natureza, as bactérias são encontradas em todos os lugares e, com a disponibilidade de nutrientes, são capazes de colonizar novos habitats, incluindo o trato gastrointestinal. Ao nascer, o trato gastrointestinal é desprovido de micro-organismos. Nas aves, os filhotes recém-nascidos adquirem a sua microbiota a partir da superfície do ovo, circundante no meio ambiente (ninho), e em sua primeira refeição. O modo de alimentação de filhotes de pinguins por regurgitação também pode aumentar a probabilidade de transmissão vertical bacteriana dos pais para o trato intestinal dos filhotes. Quando adultos, os pinguins podem adquirir parte de suas comunidades bacterianas pela água do mar, que pode funcionar tanto como um meio para transporte quanto para o crescimento de micro-organismos (Potti et al., 2002). Dessa forma, através de sucessão ecológica, o trato gastrointestinal estéril é rapidamente colonizado, formando uma comunidade microbiana densa e complexa (Dewar, 2012).

Os estudos têm mostrado que a microbiota do trato gastrointestinal tem uma grande influência sobre os processos nutricionais, fisiológicos, imunológicos e metabólicos do hospedeiro. Os micro-organismos têm um papel significativo na obtenção de energia, no metabolismo de gorduras, secreção e síntese de nutrientes, vitaminas e aminoácidos (Dewar, 2012). As bactérias da

microbiota das aves têm um papel fundamental na saúde desses animais; sua microbiota indígena suprime a colonização de bactérias invasoras, fornecendo proteção para o hospedeiro contra espécies patogênicas (Soler et al., 2010; Dewar, 2012). Dessa forma, muitos gêneros bacterianos podem trazer efeitos benéficos para o hospedeiro, tais como os *Lactobacillus* sp. (probióticos), ou efeitos prejudiciais à saúde dos mesmos, como infecções por *Salmonella* sp., por exemplo, que acarretam gastos energéticos dispendiosos para o sistema imune do hospedeiro e, conseqüentemente, isso pode atrasar o seu crescimento/desenvolvimento (Potti et al., 2002; Soler et al., 2010; Campos et al., 2013). Sob essa perspectiva, alguns agentes biológicos isolados a partir desses animais poderiam ser utilizados como indicadores da saúde animal e de perturbações do ecossistema marinho.

## **2.4 O gênero *Enterococcus* spp.**

### **2.4.1 Taxonomia**

O termo “entérococo” foi proposto por Thiercelin, em 1899, após descrever um micro-organismo diplococo Gram-positivo de origem entérica que era capaz de causar infecção. No mesmo ano, MacCallum e Hastings publicaram um estudo detalhado sobre um caso de endocardite aguda causado por um micro-organismo que eles chamaram de “*Micrococcus zymogenes*”, que foi, posteriormente, reconhecido como *Enterococcus faecalis* (Murray, 1990; Lebreton et al., 2014).

Os enterococos foram classificados por um longo período como pertencentes ao gênero *Streptococcus* e eram diferenciados dos outros componentes desse grupo por suas características fisiológicas e sorológicas. Em 1937, Sherman, visando melhorar o esquema de classificação dos estreptococos, acabou separando-os em quatro subgrupos: estreptococos de laticínios, viridans, piogênicos e fecais (*Enterococcus*).

Desde a sua descoberta, os enterococos sofreram importantes modificações em sua taxonomia, não só com relação aos critérios de caracterização do gênero, como também no que diz respeito à diferenciação das espécies. Nesse sentido, em 1970, Kalina propôs a criação de um táxon *Enterococcus* baseado no arranjo celular e em características fenotípicas das espécies pertencentes ao grupo estreptococos fecais (*Enterococcus*). Entretanto, foi apenas na metade dos anos 1980 que Schleifer e Kilpper-Balz demonstraram, com base em estudos envolvendo técnicas moleculares, que os *Enterococcus* eram suficientemente diferentes dos outros *Streptococcus* para a criação de seu próprio gênero (Teixeira et al., 2011; Lebreton et al., 2014).

A partir de 1984, as bactérias anteriormente consideradas como *Streptococcus* do Grupo D foram revisadas com base em características bioquímicas, aspectos genéticos e técnicas de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA. Esses estudos permitiram esclarecer o parentesco entre as estirpes e ampliaram o esquema de classificação utilizando ácidos nucleicos (Murray, 1990; Byappanahalli et al., 2012).

Apesar de a comparação entre sequências de DNA ser ainda considerada a melhor metodologia, outras técnicas moleculares têm

contribuído para a identificação das diferentes espécies de enterococos. O sequenciamento do 16S rRNA tem se tornado uma ferramenta adicional prática e confiável; todavia, eventualmente, não é suficiente para distinguir algumas espécies, tais como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, que são 99,9% semelhantes por esse critério. Outras técnicas vêm sendo utilizadas para auxiliar na correlação entre os dados gerados a partir de análises fenotípicas e genotípicas, tais como o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), o sequenciamento de genes codificadores da subunidade alfa da RNA polimerase (*rpoA*), da fenilalanil-tRNA sintase (*pheS*) e o fator de alongação Tu (*tufA*), bem como a tipagem por sequenciamento de múltiplos loci (MLST) e análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por meio da eletroforese em campo pulsado (PFGE), entre outras (Teixeira & Merquior, 2013; Lebreton et al., 2014).

Desse modo, filogeneticamente, os *Enterococcus* spp. pertencem ao grupo de bactérias Gram-positivas com baixo GC (varia de 37% a 45%) que compreendem o Filo Firmicutes. O gênero está incluído na família das *Enterococcaceae*, juntamente com outros gêneros bacterianos, tais como *Bavariicoccus*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (Teixeira et al., 2011; Lebreton et al., 2014).

#### **2.4.2 Caracterização do gênero *Enterococcus* spp.**

Os *Enterococcus* spp. são cocos Gram-positivos, catalase negativos, arranjados aos pares, em cadeias curtas ou ainda como células únicas. Esses

micro-organismos são anaeróbios facultativos, catalase negativos, capazes de crescer em meio de cultura contendo 6,5% de cloreto de sódio e hidrolisar a esculina na presença de sais biliares; toleram variações de pH (4,5 – 10,0) e temperatura (10 – 45 °C), sendo, em sua maioria, capazes de sobreviver a 60 °C durante 30 minutos, e adaptados às mais diversas condições ambientais (Murray, 1990; Teixeira et al., 2011; Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

Os representantes desse gênero apresentam crescimento rápido em meios de cultura enriquecidos, produzindo colônias brancas ou amareladas, dependendo da espécie, após 24 horas de incubação. As colônias são, em geral, não hemolíticas, apresentando raramente casos de alfa ou beta-hemólise. A maioria das linhagens de enterococos produz ácido teicoico glicerol associado à parede celular, que é identificado como antígeno do grupo D, mas alguns também reagem com o grupo Q. Alguns testes fenotípicos específicos ajudam na identificação das espécies, tais como as reações de fermentação de carboidratos (L-arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP), D-rafinose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose) sem produção de gás, hidrólise da arginina, da laucina- $\beta$ -naftilamina, da L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida, motilidade e produção de pigmento (Murray, 1990; Manero & Blanch, 1999; Teixeira et al., 2011, Ramsey et al., 2014). Essas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir *Enterococcus* spp. de outros cocos Gram-positivos catalase negativos gênero-espécie relacionados.

### 2.4.3 Ecologia dos *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* apresenta uma natureza ubiquitária que lhe permite sobreviver em diversos nichos ecológicos. O gênero inclui, atualmente, mais de 50 espécies (Euzéby, 2015), sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* conhecidas como as espécies mais frequentemente portadoras de fatores de virulência. Algumas espécies apresentam colônias pigmentadas, tais como *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* e *E. sulfureus*. Outras espécies apresentam motilidade, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Há espécies capazes de hidrolisar a L-pirrolidoniol-β-naftilamida (PYR) como *E. cecorum*, *E. comumbae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus*, *E. canintestini*, *E. termitis*, *E. viikiensis* e *E. devriesei* (varia entre as linhagens), e espécies que pertencem ao grupo Q de Lancefield, como *E. avium*, entre outras espécies que constituem esse gênero. Todas essas características peculiares de cada espécie têm contribuído para a adaptabilidade e a ampla distribuição do gênero *Enterococcus* na natureza.

Os enterococos são reconhecidos pela capacidade intrínseca que apresentam de portar, adquirir e transferir genes de resistência aos antimicrobianos e/ou de virulência. Genes estes que são facilmente dissemináveis pelos enterococos, via conjugação e elementos extra-cromossômicos, o que lhes confere vantagens seletivas para sua sobrevivência e disseminação no ambiente como um todo (Fisher & Phillips, 2009; Byappanahalli et al., 2012).

Os primeiros estudos envolvendo *Enterococcus* acreditavam que os “cocos Gram-positivos de origem entérica” poderiam estar relacionados a

infecções humanas e que seu principal nicho era as fezes. Mais tarde, outros trabalhos demonstraram que os enterococos, em menor ou maior número, dependendo da espécie, constituem a microbiota comensal do trato gastrintestinal, cavidade oral e do trato geniturinário de humanos e outros animais. Cada local do corpo colonizado por enterococos representa um ecossistema que é definido por características físico-químicas e histológicas únicas, constituindo um ambiente competitivo e seletivo para micro-organismos adaptados (Murray, 1990; Lebreton et al., 2014).

Como reflexo da adaptação para a vida no intestino do hospedeiro, ao longo de milhões de anos de coevolução, a análise do genoma dos enterococos tem destacado também a vantagem seletiva dessas bactérias em adquirir nutrientes necessários para o seu crescimento e sua sobrevivência em seus habitats. Isso ocorre, geralmente, por meio da dieta do hospedeiro ou de relações de alimentação cruzada com outros micro-organismos intestinais, fazendo com que os enterococos não necessitem carregar material genético adicional necessário para a sua biossíntese a partir de precursores mais simples (Lebreton et al., 2014; Gilmore et al., 2013).

Em revisão atualizada, Lebreton et al. (2014) demonstraram a distribuição do gênero enterococos na natureza e suas relações filogenéticas. Alguns padrões emergiram com respeito aos habitats nos quais essas espécies foram identificadas ou reportadas, como pode ser observado na Figura 3.

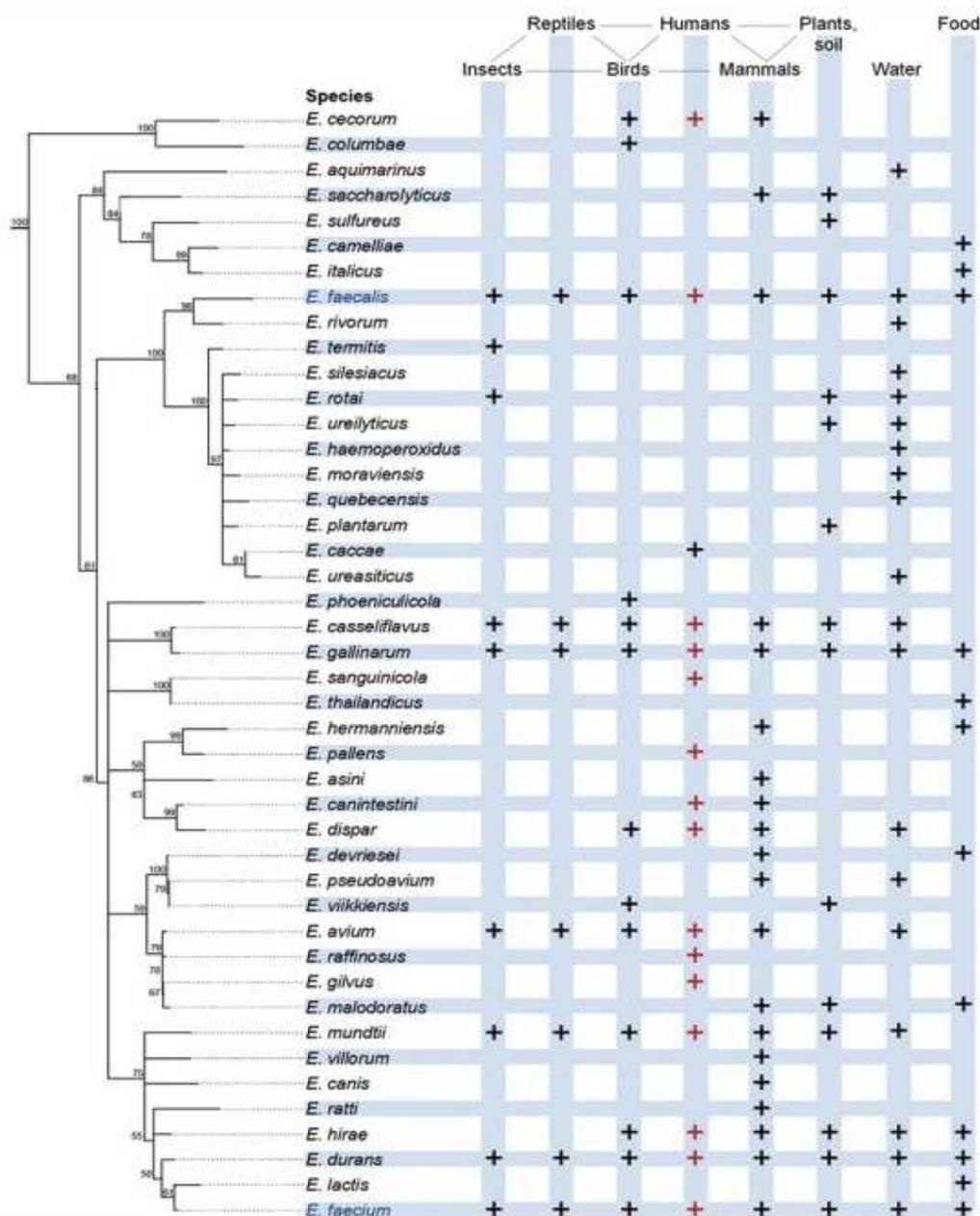


FIGURA 3. Distribuição de espécies do gênero *Enterococcus* na natureza. O dendrograma mostra as relações filogenéticas. As fontes de isolamento são indicadas para cada espécie. A cadeia alimentar é mostrada simplificada. Símbolos vermelhos e pretos indicam aquelas espécies que têm sido descritas em infecções humanas ou de colonização, respectivamente. Fonte: Adaptado de Lebreton et al. (2014).

*E. columbae* foi isolado exclusivamente de fezes de pombo e *E. cecorum* são encontrados, principalmente, no intestino das aves e, com menos frequência, no trato gastrointestinal de mamíferos (alguns mamíferos como o

gado ou suínos são alimentados com aves). Essas cepas ainda não foram isoladas de insetos que estão na base da cadeia alimentar de muitas aves, indicando que a especiação pode ter ocorrido após a separação evolutiva entre mamíferos, répteis, aves e insetos (Lebreton et al., 2014).

Já as espécies *E. aquimarinus*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. camelliae* e *E. italicus* parecem ter um tropismo por mamíferos, visto que nenhuma das cinco espécies foi isolada a partir de insetos, répteis ou aves. A espécie *E. faecalis* é encontrada ao longo de toda a cadeia alimentar e também tem emergido como um importante patógeno hospitalar oportunista. Isso sugere que, pelo menos desde o período Devoniano (o tempo do último ancestral comum de mamíferos, répteis, aves e insetos), essa espécie tem sido um membro do microbiota intestinal (Lebreton et al., 2014).

As demais espécies representadas na Figura 3 mostraram algum tropismo para os seres humanos e animais, especialmente mamíferos. A ocorrência de enterococos em ambientes como a água e as plantas pode decorrer de contaminação fecal, de necessidades nutricionais ou de adaptações ambientais a esses habitats (Lebreton et al., 2014).

Vários estudos têm contribuído para o entendimento da distribuição dos enterococos no ambiente como um todo. *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais frequentes em alimentos, plantas, ambiente e trato gastrointestinal de humanos e animais (Fisher & Phillips, 2009; Teixeira et al., 2011; Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

O trato gastrointestinal animal pode representar um ótimo reservatório de enterococos. Ostrolenk & Hunder (1946) recuperaram enterococos de vários animais (gato, camundongo, porco-da-índia, coelho, cachorro, rato, morcego, galinha, macaco e mosca). Mundt (1963) verificou também a presença de enterococos em fezes de mamíferos, répteis e aves de ambientes selvagens. Posteriormente, Martin & Mundt (1972) encontraram enterococos em várias espécies de insetos.

Em 1987, Devriese et al. (1987) avaliaram a distribuição e a prevalência das espécies de enterococos no trato intestinal de bovinos, suínos, equinos, ovinos, caprinos, cães, coelhos e aves domésticas, sendo que *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* foram as espécies mais prevalentes. Em 1991, Devriese et al. (1991) estudaram a composição da microbiota intestinal de frangos e verificaram que ocorria uma sucessão na ocorrência de espécies de enterococos dependente da idade da ave. Desse modo, a ocorrência e a frequência de algumas espécies de enterococos podem estar diretamente relacionadas à dieta, à idade e à espécie do animal/hospedeiro, bem como relacionadas a suas variações sazonais e localização geográfica (Byappanahalli et al., 2012; Maraccini et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

Em 1993, Bates et al. (1993) relataram o primeiro caso de enterococos resistente a vancomicina isolados de fonte não humana, um *E. faecium*, isolado de animais de fazenda no Reino Unido. Depois disso, vários estudos foram realizados com animais domésticos e de interesse econômico, como aves, suínos, gado de corte, com o intuito de verificar se a adição de antimicrobianos, como forma de promover o crescimento e prevenir e tratar

doenças nesses animais, poderia estar selecionando linhagens de enterococos resistentes que apresentavam risco à saúde humana (Aarestrup et al., 2000; Ruzauskas et al., 2009; Cassenego et al., 2011; Garcia-Migura et al., 2014; Lebreton et al., 2014; Li et al., 2014; Nowakiewicz et al., 2014).

Os enterococos são também frequentemente encontrados em fontes ambientais, tais como o solo, a água e as plantas, onde o seu potencial intrínseco lhes permite persistir e disseminar no ambiente (Mundt, 1961; Mundt, 1963; Svec & Sedlacek, 1999; Johnston & Jaykus, 2004; Badgley et al., 2010; Nachtigall et al., 2013). Esses habitats extraentéricos são heterotérmicos (temperaturas variáveis), em contraste com o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, em que a temperatura é relativamente constante. Além disso, há uma variedade de estressores ambientais que podem impactar negativamente a sobrevivência dos micro-organismos nesses ambientes, tais como radiação UV, salinidade, escassez de nutrientes e predação (Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014). As funções ecológicas de enterococos em habitats extraintestinais podem estar relacionadas com a decomposição da matéria orgânica, com a proteção de plantas de agentes patogênicos ou contribuir para a estabilidade da comunidade microbiana (Byappanahalli et al., 2012).

Mais recentemente, o ecossistema marinho também tem sido alvo de estudos envolvendo enterococos, por ser um ambiente ainda pouco estudado e pelo alto potencial de abrigar novas espécies (Svec et al., 2005). Grande parte dos estudos em águas marinhas é motivada pela atenção dada aos enterococos como possíveis indicadores da qualidade de águas (Ferguson

et al., 2005; Bennani et al., 2012; Maraccini et al., 2012; Dada et al., 2013; Ahmad et al., 2014). Apesar disso, há poucos estudos envolvendo animais marinhos. Layton et al. (2010) encontrou enterococos nas fezes de gaivotas, focas e leões-marinhos que habitavam/frequentavam a região da Baía de São Francisco (Califórnia, EUA). Barros et al. (2011) verificou a presença de *E. faecium* e *E. faecalis* em amostras fecais de uma espécie de peixe (*Sparus aurata*) capturada no Oceano Atlântico, na costa de Portugal. Marinho et al. (2013) também isolou *E. faecium*, *E. hirae*, *E. faecalis* e *E. gallinarum* de fezes de equinodermos coletados de águas de Açores, Portugal.

Em alimentos, os enterococos são conhecidos como bactérias ácido-láticas (LAB), por serem anaeróbios facultativos, quimio-organotróficos e com metabolismo homofermentativo que resulta na produção de L-(+)-ácido-lático como produto final predominante da fermentação da glicose. Dessa forma, representam uma importante ferramenta na tecnologia de produção de alimentos fermentados porque contribuem no amadurecimento e no desenvolvimento de sabor de muitos queijos, iogurtes e manteiga, por exemplo (Girrafa, 2002; Franz et al., 2003; Teixeira et al., 2011).

Na indústria alimentícia, também são utilizados como culturas *starter*, probióticos (Franz et al., 2003; Gomes et al., 2010) e inibidores de espécies patogênicas em alimentos, tais como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, devido à produção de bacteriocinas (Girrafa, 2002; Morais et al., 2012; Nes et al., 2014). No entanto, os enterococos podem ser indicadores de contaminação fecal na produção e no processamento de alimentos, bem como podem ser reservatórios de genes de resistência,

capazes de se disseminarem na cadeia alimentar, contribuindo para a propagação da resistência a antibióticos na população humana (Fracalanza et al., 2007; Maietti et al., 2007; Riboldi et al., 2009; Prichula et al., 2013).

Estudos epidemiológicos salientam que, pela sua natureza oportunista, os enterococos têm emergido, a partir da década de 1970, como patógenos associados a Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde – IRAS (Murray et al., 1990; Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004; Gales et al., 2009; Bender et al., 2009; Higueta & Huycke, 2014). Estima-se que os enterococos resistentes à vancomicina sejam responsáveis por cerca de 20.000 infecções que ocorrem entre pacientes hospitalizados, a cada ano, nos Estados Unidos, sendo que cerca de 1.300 mortes são atribuídas a essas infecções (CDC, 2013).

Entre as espécies encontradas em infecções humanas, *E. faecalis* é a mais frequente, representando mais de 90% dos isolados clínicos. A segunda espécie mais frequente é *E. faecium*, sendo encontrada em cerca de 5% dos isolados. Além dessas espécies, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans*, *E. raffinosus*, entre outras, também são encontradas em amostras clínicas (Murray, 1990; Higashide et al., 2005; d’Azevedo et al., 2006). É importante salientar que as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, devido à presença do gene *vanC*, são conhecidas por apresentar resistência intrínseca à vancomicina, antimicrobiano utilizado como uma das últimas opções terapêuticas em casos de infecções causadas por enterococos e outros cocos Gram-positivos (Teixeira & Merquior, 2013; Lebreton et al., 2014). Em vista disso, tem-se considerado os *Enterococcus*

como um dos principais gêneros microbianos com elevado impacto clínico (Magiorakos et al., 2010; Johansson & Rasmussen, 2013; CDC, 2013; Higuira & Huycke, 2014).

#### **2.4.4 Resistência antimicrobiana**

Uma característica marcante dos *Enterococcus* spp. é sua resistência a diversos antimicrobianos usados comumente na clínica médica e veterinária. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre naturalmente, é codificada no cromossomo bacteriano e pode estar presente na maioria dos enterococos ou particularmente em alguma espécie. Já a resistência adquirida é variável e ocorre com aquisição de elementos genéticos móveis de outras bactérias, tais como plasmídeos e transposons ou devido a mutações cromossomais espontâneas que podem ocorrer no DNA bacteriano (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009; Teixeira, et al., 2011).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a cefalosporinas, sulfonamidas, clindamicina, baixos níveis de  $\beta$ -lactâmicos e de aminoglicosídeos. Contudo, podem adquirir resistência a muitos outros antimicrobianos, tais como cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, níveis elevados de aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos e quinolonas (Murray, 1990; Shepard & Gilmore, 2002a, Teixeira, et al., 2011; CLSI, 2013; Kristich et al., 2014).

A aquisição de resistência pode ocorrer em diferentes nichos, inclusive no trato gastrointestinal dos animais, competindo com outras bactérias que podem estar sob pressão seletiva de níveis terapêuticos de antimicrobianos (Mundy et al., 2000). Isolados de enterococos exibindo resistência adquirida a diversos antimicrobianos têm sido descritos com frequência em diferentes hospedeiros e locais (Poeta et al., 2005; d'Azevedo et al., 2006; Gales et al., 2009, Bennani et al., 2012; Lebreton et al., 2013).

A resistência bacteriana pode ser causada por diversos fatores, tais como a inativação do antibiótico por alterações químicas na molécula bioativa (geralmente promovidas por enzimas bacterianas); modificação do sítio-alvo que leva à perda de sensibilidade ao antimicrobiano; mudanças na bomba de efluxo e na permeabilidade externa da membrana que promove a redução da concentração do antimicrobiano sem sua modificação química (Guimarães et al., 2010; DebRoy et al., 2014). Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se compreender como a bactéria pode desenvolver a resistência (Guimarães et al., 2010). Nesse sentido, serão abordados a seguir os mecanismos de resistência dos enterococos frente a algumas classes de antimicrobianos avaliadas neste estudo.

#### **2.4.5 $\beta$ -lactâmicos**

Os enterococos apresentam uma resistência relativa aos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que a resistência varia entre as diferentes classes de

betalactâmicos e entre as espécies de enterococos. As penicilinas são os representantes da classe com maior atividade contra enterococos (sendo a ampicilina a substância mais ativa contra esse gênero), seguidas de carbapenêmicos e cefalosporinas, que apresentam menor atividade antimicrobiana. A resistência frente aos  $\beta$ -lactâmicos é adquirida pela produção de  $\beta$ -lactamases ou modificações estruturais nas PBP's, tornando, assim, os enterococos menos suscetíveis aos antimicrobianos dessa classe (Murray, 1990; Kristich et al., 2014).

#### **2.4.6 Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos apresentam efeito bactericida por ligarem-se irreversivelmente à porção 16S rRNA da subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do RNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas. Os enterococos são resistentes intrinsecamente a baixos níveis de aminoglicosídeos, tais como estreptomicina e gentamicina, que são os principais antimicrobianos de amplo espectro dessa classe (Murray, 1990; Guimarães et al., 2010).

A resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos é decorrente de uma diminuição na permeabilidade através da membrana citoplasmática do enterococos. Contudo, a associação do aminoglicosídeo com um antimicrobiano com ação sobre a parede celular, glicopeptídeo ou  $\beta$ -lactâmico, resultará em um efeito sinérgico bactericida (Murray, 1990).

Já a resistência adquirida a altos níveis de estreptomicina e gentamicina ocorre devido à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como fosfotransferases, nucleotidiltransferases e acetiltransferases, que levam à perda do sinergismo e diminuem o efeito bactericida no tratamento de infecções por enterococos (Shepard & Gilmore, 2002a; Kristich et al., 2014).

#### **2.4.7 Glicopeptídeos**

Os antibióticos glicopeptídicos, vancomicina e teicoplanina têm se tornado os fármacos de primeira linha no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas com resistência a diversos antimicrobianos. A resistência a esses glicopeptídeos é um grave problema dentro de hospitais, visto que são uma das principais causas de aumento nos custos das internações e nos casos de mortalidade (Cattoir & Leclercq, 2013; CDC, 2013; Kristich et al., 2014). Os primeiros enterococos resistentes à vancomicina (VRE) surgiram no final da década de 1980 na Europa e nos Estados Unidos (Cattoir & Leclercq, 2013). No Brasil, o primeiro relato de VRE ocorreu na cidade de Curitiba. Desde então, cepas com esse fenótipo têm sido descritas isoladas de diferentes fontes (d'Azevedo et al., 2006; Fracalanza et al., 2007; Riboldi et al., 2009; Nachtigall et al., 2013).

Os glicopeptídeos inibem a biossíntese da parede celular bacteriana pela ligação com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem a parede celular (Guimarães et al., 2010). A

resistência aos glicopeptídeos ocorre devido a uma alteração no alvo de ligação D-alanil-D-alanina por D-alanil-D-lactato (que produz níveis elevados de resistência) ou para D-alanil-D-serina (que produz níveis baixos de resistência), diminuindo, assim, a afinidade pelo glicopeptídeo e interferindo no mecanismo de ação deste (Cattoir & Leclercq, 2013).

A resistência aos glicopeptídeos em enterococos tem sido classificada em nove fenótipos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN), sendo cada tipo associado a diferentes elementos gênicos. Entre os mais importantes, o fenótipo VanA é caracterizado pela resistência a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina, e o fenótipo VanB está associado à resistência em níveis variados de vancomicina e suscetibilidade à teicoplanina. Já o fenótipo VanC está relacionado à resistência intrínseca, cujo determinante tem localização cromossômica e caracteriza resistência em níveis baixos à vancomicina e suscetibilidade à teicoplanina. O fenótipo VanC pode resultar da expressão de quatro determinantes genéticos, *vanC1*, *vanC2* e *vanC3*, *vanC4*, sendo o primeiro característico da espécie *E. gallinarum*; enquanto os genótipos *vanC2-C4* foram detectados em *E. casseliflavus* (Teixeira & Merquior, 2013; Cattoir & Leclercq, 2013; Kristich et al., 2014).

#### **2.4.8 Macrolídeos**

Os macrolídeos atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas (Murray, 1990;

Guimarães et al., 2010). Os dois principais mecanismos de resistência envolvendo isolados de enterococos resistentes a macrolídeos são o resultante de modificação no sítio-alvo de ação do antimicrobiano (devido a uma rRNA metilase codificadas por genes *erm*) e um sistema de bomba de efluxo mediada pela proteína ligada à membrana, codificada por genes *mef* (A/E) e genes *msr* (Zou et al., 2011).

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

#### **2.4.9 Quinolonas**

As quinolonas e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) são fármacos bactericidas muito utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, uma vez que apresentam boa seletividade para células bacterianas. As fluoroquinolonas agem inibindo a topoisomerase IV de bactérias Gram-positivas; em bactérias Gram-negativas o alvo é a topoisomerase II (DNA-girase), topoisomerases essenciais para a viabilidade celular em células procarióticas (Guimarães et al., 2010). A resistência às quinolonas pode decorrer de mutações pontuais nas sequências de DNA das enzimas (o que impede a ligação eficiente do antimicrobiano com a enzima), alteração da

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

#### **2.4.10 Cloranfenicol**

O cloranfenicol liga-se à subunidade 30S do ribossomo e inibe o movimento dos ribossomos ao longo do mRNA, devido à inibição da peptidiltransferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica (Guimarães et al., 2010). Nos enterococos, a resistência ao cloranfenicol está relacionada, principalmente, ao gene *cat*, presente no cromossomo ou em plasmídeos, que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase que é capaz de acetilar um grupamento hidroxila na molécula do antimicrobiano de forma a perder a capacidade de ligação ao ribossomo (Murray, 1990).

#### **2.4.11 Nitrofurantoína**

A nitrofurantoína é utilizada comumente na prevenção e no tratamento de infecções do trato urinário. Além disso, devido ao seu amplo espectro de ação, também é adicionada à alimentação animal para prevenir e tratar infecções gastrointestinais. Esse agente antimicrobiano age inibindo

vários mecanismos enzimáticos bacterianos, interferindo, assim, na síntese de proteínas essenciais para o micro-organismo (Masunari & Tavares, 2006).

#### **2.4.12 Tetraciclina**

As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro e bastante eficazes frente a diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As tetraciclinas inibem a síntese de proteínas por meio da ligação com a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo. Como resultado, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada e a liberação de proteínas é inibida (Guimarães et al., 2010). A resistência à tetraciclina pode ocorrer por determinação cromossomal ou mediada por plasmídeos e transposons. Diversos genes têm sido associados à resistência à tetraciclina; os genes *tet(K)* e *tet(L)* destacam-se pelo efluxo da droga através da membrana, e os genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* alteram a conformação ribossomal, o que dificulta a ligação do antimicrobiano com o seu sítio-alvo (Murray, 1990, Frazzon et al., 2010).

Devido ao aumento de resistência bacteriana às tetraciclinas, o seu uso tem diminuído. Contudo, o desenvolvimento recente de um derivado semissintético que inibe a bomba de efluxo, a tigeciclina, indica o interesse contínuo nessa classe (Guimarães et al., 2010).

### 2.4.13 Genes de virulência

Estudos têm identificado diferentes genes codificadores de proteínas que podem desempenhar um papel fundamental na patogenicidade dos enterococos e que lhes possibilitam uma vantagem seletiva sobre outros microorganismos, os chamados genes de virulência. Características que determinam virulência são, entre outras, a aderência ao tecido do hospedeiro, a invasão e a formação de abscesso, a modulação da resposta inflamatória e a secreção de produtos tóxicos (Eaton & Gasson, 2001).

Os enterococos não apresentam os potentes fatores de virulência encontrados em muitas bactérias Gram-positivas patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Entretanto, apresentam características importantes que contribuem para sua virulência e os tornam efetivos patógenos oportunistas com grande expressão e representatividade nas áreas médica e veterinária, na indústria alimentícia e ambiental (Fracalanza, 2007).

Vários fatores de virulência já foram identificados no gênero *Enterococcus*, presentes tanto no cromossomo bacteriano quanto em elementos extracromossomais, como plasmídeos e transposons. Entre as principais moléculas associadas à virulência em enterococos estão a citolisina, a adesina de colágeno, a gelatinase e a substância de agregação (Eaton & Gasson, 2001; Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2004; Medeiros et al., 2013; Johansson & Rasmussen, 2013). Entre as espécies de enterococos, *E. faecalis* apresenta a maior incidência de fatores de virulência, possuindo

múltiplos determinantes de virulência, o que reforça a evidência da patogenicidade (Medeiros, 2010).

#### **2.4.14 Citolisina**

A citolisina é uma toxina bacteriana com atividade hemolítica e bactericida contra células procarióticas e eucarióticas. Codificada por um *operon* composto de oito genes (*cyLL*, *cyLs*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cyIL*, *cyIR1* e *cyIR2*) que podem ser carregados por vários plasmídeos, responsivos a feromônios, ou integrados ao cromossomo bacteriano (Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2004; Hallgren et al., 2009; Medeiros et al., 2013).

Enterococos produtores de citolisina têm atividade citolítica sobre células do hospedeiro, acarretando inibição dos leucócitos e lise dos eritrócitos, com consequente liberação de íons de ferro e outros nutrientes. A quantidade de recurso disponível acaba por influenciar as populações de micro-organismos colonizadores e pode ser considerada uma característica vantajosa às células citolíticas em relação a isolados não produtores da enzima (Golińska et al., 2013).

#### **2.4.15 Gelatinase**

A gelatinase, codificada pelo gene *geE* (cromossomal), é uma protease, classificada como enzima metaloendopeptidase extracelular, capaz de hidrolisar substratos como a gelatina, o colágeno, a caseína, a hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (Eaton & Gasson, 2001;

Fisher & Phillips, 2009). A gelatinase contribui na patogênese enterocócica, uma vez que degrada os tecidos do hospedeiro (para fornecimento de nutrientes peptídicos para o microrganismo) e também pode auxiliar na formação de biofilme (Marra et al., 2007; Fisher & Phillips, 2009).

#### **2.4.16 Adesina de colágeno**

A adesina de colágeno (Ace) é uma proteína envolvida na aderência dos enterococos às células do hospedeiro, codificada pelo gene *ace*, categorizada entre os componentes da superfície microbiana como da família de moléculas de matriz adesiva (do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* – MSCRAMM). A adesina de colágeno de *E. faecalis* foi o primeiro de três MSCRAMMs que foram extensivamente caracterizadas nos enterococos. Essa proteína reconhece e estabelece a ligação a proteínas presentes em células do hospedeiro, como a laminina, o colágeno tipo I e tipo IV e a dentina. Dessa forma, a expressão do gene parece contribuir para a patogênese de processos infecciosos ao facilitar a ligação com a célula-alvo (Shepard & Gilmore, 2002b; Dunny et al., 2014; Hancock et al., 2014).

#### **2.4.17 Substância de agregação**

A substância de agregação (Agg) é uma proteína de superfície dos enterococos, codificada por vários plasmídeos responsivos a feromônios, que auxilia na formação de agregados, facilitando a transferência de plasmídeos,

durante a conjugação bacteriana. Estudos salientam também que a Agg pode facilitar a translocação de *E. faecalis* através do epitélio intestinal, mediar a aderência às células epiteliais renais e a componentes da matriz extracelular, bem como aumentar a sobrevivência em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Deleções na região N-terminal ou no domínio de RGD da Agg resultaram numa redução significativa da virulência de *E. faecalis* em modelo de endocardite (Submuth et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002b; Dunny et al., 2014). Quatro plasmídeos foram descritos como responsáveis pela codificação da proteína Agg em *E. faecalis* (pAD1, pCF10, pAM373, pPD1), sendo que os genes relacionados a esses plasmídeos são, respectivamente, *asa1*, *asc10*, *asa373* e *asp1* (Camargo et al., 2008; Hancock et al., 2014).

#### **2.4.18 Biofilmes**

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz de substâncias extracelulares produzidas pela própria comunidade (O'Toole et al., 2000). A adoção desse fenótipo alternativo proporciona aos micro-organismos estratégias e mecanismos que podem facilitar e/ou prolongar sua sobrevivência em diversos nichos ambientais (Kostakioti et al., 2013).

O processo de formação dos biofilmes envolve uma mudança na fisiologia do crescimento de células bacterianas planctônicas, as quais passam a se organizar em comunidades onde a comunicação entre as células é responsável por coordenar a expressão de genes e a atividade metabólica do

biofilme (Dunny et al., 2014). Essa comunicação é realizada por moléculas sinalizadoras que são produzidas em resposta à densidade populacional bacteriana na comunidade. Esse mecanismo, que regula processos como virulência, simbiose e transferência horizontal de genes, é conhecido como *quorum sensing* e traz benefícios adaptativos para populações bacterianas capazes de formar biofilme (Chen et al., 2007).

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

A produção de biofilme é comum principalmente entre os isolados clínicos de *E. faecalis*. Vários determinantes genéticos que desempenham um papel importante na formação e na maturação dos biofilmes foram relatados em isolados dessa espécie. Adesinas de superfície, tais como as proteínas associadas à parede celular (Agg, Esp, Ace), autolisinas e glicolipídeos, predominam precocemente durante a fase de adesão. Já os polissacarídeos, o ácido lipoteicóico, o DNA extracelular e as proteases contribuem para a maturação do biofilme. Entretanto, fatores como a composição do meio, as condições físico-químicas e o tipo de superfície utilizada para a formação de biofilmes podem ter uma grande influência sobre sua formação (Mohamed &

Murray, 2005; Tsikrikonis et al., 2012; Dunny et al., 2014). Dados sobre a capacidade de formação de biofilme por enterococos de origem animal são ainda escassos e, até o momento, não há trabalhos publicados sobre a produção de biofilme por *Enterococcus* isolados de animais marinhos.

#### **2.4.19 PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)**

A eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE) é um método de tipagem molecular que visa discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, comparando características genotípicas. É utilizado tanto para estudos epidemiológicos de surtos hospitalares quanto na comparação da estrutura genética de populações bacterianas (Tenover et al., 1995; Magalhães et al., 2005; Teixeira & Merquior, 2013).

O DNA cromossomal bacteriano é incorporado em blocos de agarose e digerido com enzimas de macrorrestrição ou corte raro, como a *SmaI*, que clivam o DNA em grandes fragmentos. Os fragmentos gerados são submetidos à eletroforese com alternância de orientação de campo elétrico, que permite a separação de fragmentos de elevado peso molecular. Posteriormente, a análise dos fragmentos é realizada com o auxílio de sistemas de imagem que avaliam a similaridade entre os padrões de bandas gerados (Saeedi et al., 2002; Furukawa & Suzuki, 2013).

O desenvolvimento de sistemas de tipagem genética tem contribuído para o rastreamento e a compreensão da disseminação de microrganismos em diversos nichos, uma vez que esses sistemas têm como base as observações

de que isolados de uma mesma espécie podem apresentar diferenças no DNA decorrentes de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (Tenover et al., 1995). O PFGE é reconhecido como padrão ouro para identificação de muitas linhagens fúngicas, de protozoários e de bactérias, como os enterococos (Saeedi et al., 2002; Magalhães et al., 2005; Teixeira et al., 2011; Furukawa & Suzuki, 2013).

O PFGE é utilizado para o estudo da disseminação dos enterococos em diferentes ambientes e hospedeiros, bem como para a compreensão da estrutura populacional, da evolução de linhagens multirresistentes e virulentas, e da emergência e dispersão global de certos complexos clonais responsáveis por surtos causados por enterococos (Camargo et al., 2008; d'Azevedo et al., 2008; Teixeira & Merquior, 2013).

O PFGE tem sido aplicado também para o rastreamento de contaminação fecal por linhagens de *Enterococcus* spp. em águas recreativas no Japão (Furukawa & Suzuki, 2013). Martines-Urtaza & Liebana (2005) avaliaram a distribuição clonal e persistência de *Salmonella* no ambiente marinho através de PFGE. Diversos estudos têm demonstrado que o PFGE é uma técnica de tipagem molecular com alto poder discriminatório e reprodutibilidade. Além disso, uma grande vantagem dessa técnica baseia-se no fato de ela analisar o genoma como um todo, diferente de outros métodos de tipagem molecular (Tenover et al., 1995; Saeedi et al., 2002; Teixeira et al., 2011; Furukawa & Suzuki, 2013).

Entretanto, existem certas limitações na sua utilização, tal como a necessidade de equipamentos especializados e o preço elevado, o tempo

prolongado para a obtenção dos resultados e a ocorrência de eventos genéticos que poderiam gerar mudanças nos perfis de PFGE. Desse modo, essa técnica não é recomendada para análises epidemiológicas de períodos prolongados (Tenover et al., 1995; Saeedi et al., 2002; Teixeira & Merquior, 2013).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostras

Suabes cloacais de onze pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) foram coletados de animais vivos e mortos, conforme a autorização prévia do SISBIO (n° 20185), do período de novembro de 2012 a outubro de 2013. As aves foram encontradas durante os monitoramentos realizados pela equipe do CECLIMAR no Litoral Norte do Rio Grande do Sul.

O CECLIMAR está localizado no município de Imbé (RS) e é vinculado ao Instituto de Biociências da UFRGS. A equipe do CECLIMAR desenvolve programas de extensão que divulgam à comunidade informações técnico-científicas provenientes das pesquisas desenvolvidas na Universidade, principalmente projetos ligados à educação ambiental. Um desses programas é o monitoramento realizado pelo Centro de Reabilitação de Animais Silvestres e Marinhos (CERAM), que consiste em percorrer periodicamente as áreas que compreendem a extensão de Imbé a Torres e de Tramandaí a Quintão. A cada semana, uma das áreas é monitorada, com o intuito de registrar e/ou recuperar os animais debilitados ou mortos na costa do Litoral Norte do Rio Grande do Sul (CECLIMAR, 2015).

### 3.2 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas conforme um protocolo (Apêndice A) que recomenda alguns cuidados que foram adotados antes, durante e após cada coleta com o objetivo de preservar a integridade do material biológico. Além disso, cada coleta foi realizada antes do tratamento dos animais com qualquer tipo de ração ou medicamento, uma vez que isso poderia influenciar nos resultados.

Dessa forma, uma pequena quantidade de resíduo fecal desses animais foi coletada com um suabe estéril e armazenada em meios de cultivo para transporte. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFRGS para análises microbiológicas posteriores.

A maioria das amostras foi coletada de animais vivos, com exceção de duas, que foram obtidas de animais mortos sob grau de decomposição *Code 2* (Geraci, 2005). Segundo os parâmetros estabelecidos por Geraci (2005) para análises microbiológicas e moleculares, há um total de 5 estágios que devem ser considerados durante a coleta: o primeiro estágio (*Code 1*) refere-se ao animal ainda vivo; no segundo estágio (*Code 2*), o animal está morto, mas se apresenta ainda fresco, com a carcaça intacta e com boa aparência corporal; e, no estágio *Code 3*, o animal encontra-se com a carcaça aparentemente intacta, contudo já apresenta sinais de decomposição, como odor característico, membranas mucosas secas, olhos afundados ou ausentes, entre outras características. No *Code 4*, o animal encontra-se em um estágio de decomposição avançado; a carcaça pode estar intacta, entretanto,

apresenta danos severos e um odor muito forte; e, no *Code 5*, praticamente só resta o esqueleto, o que restringe muito os estudos sobre o histórico de vida do animal.

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

Os suabes contendo amostras fecais dos 11 pinguins-de-magalhães foram processados no Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBS/UFRGS. A metodologia empregada para a seleção e o isolamento de bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foi baseada em meios preconizados por Teixeira et al. (2011).

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

Após o período de incubação, trinta unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas, aleatoriamente, conforme metodologia recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 1998). Posteriormente, essas culturas foram submetidas aos testes preliminares de

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

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

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

### **3.5 Produção da enzima catalase**

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

### 3.6 Análise microscópica das células bacterianas

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

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

### 3.7 Preservação dos isolados bacterianos

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

### 3.8 Extração do DNA bacteriano

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

### 3.9 Confirmação do gênero *Enterococcus* por PCR

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

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

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

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

A reação foi incubada em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; e extensão final a 72 °C por 7 minutos. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* SS1274 foram utilizadas como controles positivos durante as reações. O amplicon esperado com tamanho de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

### **3.10 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp.**

#### **por PCR convencional**

A identificação molecular dos enterococos foi realizada por PCR convencional, primeiramente, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para identificar algumas das espécies de enterococos mais frequentemente relatadas na literatura em amostras ambientais: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus*

*gallinarum*. As espécies que não foram passíveis de identificação por meio dessas reações foram identificadas, posteriormente, com base em testes fisiológicos e reações com oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para as espécies *Enterococcus hirae* e *Enterococcus mundtii*.

As reações da PCR foram otimizadas para um volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão de reação da *taq* (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos gerados, temperaturas de anelamentos e referências consultadas estão listados na Tabela 3.

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

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

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

Os produtos foram amplificados em termociclador *LifePro Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento (a temperatura variou para cada espécie, conforme Tabela 3) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto; e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Cepas-padrão e isolados identificados em trabalhos anteriores por sequenciamento da região 16S (Santestevan, 2014) foram utilizadas como controles para as seguintes reações: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* 1887, *E. gallinarum* RS-64, *E. hirae* C10 e *E. mundtii* J5. Os amplicons esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

### **3.11 Caracterização fenotípica de isolados não identificados**

Os isolados não identificados pela técnica de PCR foram caracterizados presuntivamente em nível de espécie por testes fisiológicos convencionais seguindo as recomendações propostas no *Manual of Clinical Microbiology* (Teixeira et al., 2011). Esses ensaios incluíram testes para verificar a capacidade dos isolados de produzir ácidos a partir de diversas fontes de carboidratos (L-arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP), D-rafinose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose), utilizar piruvato, hidrolisar arginina, tolerar o telurito de potássio, produzir pigmento e a motilidade. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* 1887, *E.*

*gallinarum* RS-64, *E. hirae* C10 e *E. mundtii* J5 foram utilizadas como controle para os testes.

### 3.12 Fermentação de carboidratos

Os testes para a verificação da produção de ácidos pela utilização de carboidratos, L-arabinose, manitol, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (MGP), D-rafinose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose foram realizados em tubos. Cada tubo continha o meio teste composto por água peptonada, 0,1% de solução alcoólica do indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt<sup>®</sup>) e 1% do carboidrato a ser testado: L-arabinose (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), Manitol (Nuclear<sup>®</sup>), MGP (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), D-rafinose (Vetec<sup>®</sup>), Sacarose (Vetec<sup>®</sup>), D-sorbitol (Difco<sup>®</sup> Laboratories) ou L-sorbose (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos, sendo mantido na faixa de 7,2 – 7,6.

Os ensaios foram realizados com cultivos recentes dos isolados em ágar BHI (*Himedia*<sup>®</sup>), obtidos após incubação a 37 °C, por 24 horas, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Cem microlitros de cada suspensão bacteriana foram inoculados nos tubos contendo os meios testados, e estes foram incubados a 37 °C por 7 dias. Diariamente, realizaram-se as leituras e as interpretações, observando-se alteração de cor dos meios testados devido à mudança de pH. A mudança da coloração púrpura para amarelo, indicando a

acidificação do meio pela fermentação do carboidrato, foi considerada como reação positiva.

### 3.13 Utilização do piruvato de sódio

A utilização do piruvato de sódio foi verificada inoculando-se 100 µL de cada suspensão bacteriana em tubos contendo 1% de triptona (BD<sup>®</sup>), 0,5% de extrato de levedura (Himedia<sup>®</sup>), 0,5% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (LabSynth<sup>®</sup>), 0,5% de NaCl (Dinâmica<sup>®</sup> Química Contemporânea Ltda.), 1% de piruvato de sódio (Nuclear<sup>®</sup>) e 0,01% do indicador de pH azul de bromotimol. O pH da solução foi aferido para 6,8 antes da inoculação dos micro-organismos. Os tubos foram incubados a 37 °C e realizaram-se as leituras e as interpretações por 7 dias. Os isolados positivos para a utilização do piruvato apresentaram coloração amarela e os negativos mantiveram a coloração púrpura.

### 3.14 Hidrólise da arginina

A hidrólise da arginina foi verificada com a utilização do meio *Decarboxylase Base Moeller* (peptona de carne 0,5%, extrato de levedura 3% e glicose 1%) acrescido de 1% de L-arginina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e indicador de pH púrpura de bromocresol (Mallinckrodt<sup>®</sup>). O pH das soluções foi aferido antes da inoculação dos micro-organismos para uma faixa de 7,2 – 7,6. Cem microlitros de cada suspensão bacteriana (aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) foram inoculados nos tubos contendo o meio, e foi adicionada uma camada de cerca 10 mm de óleo mineral estéril (Proquímios<sup>®</sup>). Os tubos foram incubados a 37

°C por sete dias. A manutenção da coloração púrpura, inicialmente observada no meio, indicou reação positiva, devido à alcalinização do meio, em decorrência da hidrólise do substrato proteico; o controle negativo (sem arginina) apresentou uma coloração amarela decorrente da acidificação do meio pelo consumo de glicose.

### **3.15 Tolerância ao telurito de potássio**

A tolerância ao telurito de potássio foi observada inoculando-se o isolado a ser testado em ágar Mueller-Hinton (Acumedia<sup>®</sup>, Neogen, Michigan) acrescido de 0,04% de telurito de potássio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), que só foi adicionado ao meio após a autoclavagem, pois é termolábil. Após incubação durante 24 horas a 37 °C por até 7 dias, o aparecimento de colônias enegrecidas na superfície do meio indicou reação positiva para o teste.

### **3.16 Produção de pigmento**

A produção de pigmento foi observada em culturas semeadas em ágar BHI (Himedia<sup>®</sup>), utilizando-se um suabe para observar a presença de coloração amarela das colônias consideradas positivas. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *E. casseliflavus* 1887.

### 3.17 Motilidade

O teste para verificação da motilidade foi realizado inoculando-se as amostras bacterianas com o auxílio de agulha bacteriológica em meio semissólido *SIM Medium* (Himedia®), seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. A observação de um crescimento difuso, radiando-se fora da linha central de inoculação, indicou resultado positivo. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *E. casseliflavus* 1887.

### 3.18 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados foi avaliado por meio do teste de disco-difusão em ágar, seguindo-se as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2013). Os ensaios foram realizados com cultivos dos isolados em ágar BHI (Himedia®) obtidos após incubação a 37 °C, por 24 horas, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL).

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

cloranfenicol – CLO (30µg), eritromicina – ERI (15µg), nitrofurantoína – NIT (300µg), norfloxacin – NOR (10µg), tetraciclina – TET (30µg), vancomicina – VAN (30µg) (Sensifar<sup>®</sup>, Cefar Diagnóstica Ltda). Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A), foram utilizados discos de estreptomicina – EST (300 µg) e gentamicina – GEN (120 µg) (Sensifar<sup>®</sup>, Cefar Diagnóstica Ltda).

Após incubação por 24 horas, a 37 °C. foram realizadas leituras e interpretações dos diâmetros dos halos de inibição, segundo as recomendações do CLSI (2013). Para controle de qualidade dos testes de suscetibilidade, foram utilizadas as seguintes amostras-padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212.

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

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

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

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Referência
<b>tet(M)_F</b>	GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG	657	Aarestrup et al. (2000)
<b>tet(M)_R</b>	CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA		
<b>tet(L)_F</b>	ACT CGT AAT GGT GTA GTT GC	625	Frazzon et al. (2010)
<b>tet(L)_R</b>	TGT AAC TCC GAT GTT TAA CAC G		
<b>erm(B) 1</b>	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	639	Sutcliffe et al. (1996)
<b>erm(B) 2</b>	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC		

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

- a) Para o gene *tet(M)*: 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C; e 10 minutos a 72 °C (Aarestrup et al., 2000).
- b) Para o gene *tet(L)*: 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C e 1 minuto a 72 °C; e 10 minutos a 72 °C (Frazzon et al., 2010).
- c) Para o gene *erm(B)*: 3 minutos a 93 °C; 35 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 57 °C e 1 minuto a 72 °C; e 5 minutos a 72 °C (Sutcliffe et al., 1996).

Como controle positivo para a presença dos genes testados, foi utilizado o isolado *E. faecalis* 612 oriundo de estudo anterior (Medeiros, 2011). Os amplicons esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de brometo de etídio (Ludwig Biotecnologia) e visualizados sob luz ultravioleta.

### 3.20 Detecção de genes de virulência *geIE*, *cylA*, *ace* e *asa*

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

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

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

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham 1x de tampão de reação da *Taq* (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*geIE* – Invitrogen®; *cylA*, *ace* e *asa* – IDT®), 1U de *Taq* DNA

polimerase (Invitrogen®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).

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

### **3.21 Detecçãõ da enzima gelatinase**

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

### 3.22 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

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

Após esse período de incubação, o caldo TSB contendo crescimento bacteriano foi descartado. Em seguida, foi realizada a lavagem dos poços com 200 µL de solução salina 0,85% estéril (sendo essa etapa repetida por três vezes) para a retirada das células planctônicas. Posteriormente, a microplaca foi invertida sobre papel absorvente a fim de secar os poços e, na sequência, as placas foram fixadas com 150 µL de metanol P.A. (Vetec®) durante 20 minutos. Transcorrido esse tempo, a microplaca foi invertida e mantida em temperatura ambiente para secagem por 16 horas.

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

### **3.23 Cálculo para determinação do grau de formação do biofilme**

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

$OD \leq OD_c$	Não formador (N.F)
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Fraco formador (FR)
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Moderado formador (M)
$4 \times OD_c < OD$	Forte formador (F)

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

O DNA cromossômico dos isolados bacterianos foi analisado após extração, tratamento enzimático e separação dos fragmentos gerados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). A técnica de PFGE foi realizada de acordo com protocolos adaptados de Pinto et al. (2013).

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

Após solidificação, os blocos de agarose, contendo as células bacterianas, foram submetidos ao tratamento com solução de lise [6 mM Tris-HCl (Vetec®) pH 7,6; 1 M NaCl (Vetec®), 100 mM EDTA (Vetec®) pH 7,5; 0,5% (p/v) de Brij 58 (Sigma-Aldrich®), 0,5% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio (Sigma-Aldrich®), 0,2% de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich®), 1 mg/mL de

lisozima (Sigma-Aldrich®) e 10 U/mL de mutanolisina (Sigma-Aldrich®)] e incubados por 18-24 horas a 37 °C, sob agitação. Posteriormente, essa solução foi substituída pela solução ESP [0,5M EDTA (Vetec®), pH 8,0; 1% (p/v) lauril sarcosinato de sódio (Sigma-Aldrich®), 0,1 mg/mL proteinase K (Sigma-Aldrich®)], incubando-se por 1 hora a 50 °C. Após esse período de incubação, repetiu-se mais uma troca de solução ESP e o material foi novamente incubado nas mesmas condições citadas anteriormente. A partir dessa etapa, um dos blocos de agarose (*plug*) foi imediatamente preparado para a digestão enzimática.

O *plug* escolhido foi lavado com 2 mL do tampão TE [10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 mM EDTA (Vetec®)] por seis vezes (uma vez a cada 20 minutos) e os *plugs* restantes foram mantidos a 4 °C para repetições, caso necessário. Depois disso, o *plug* foi tratado com o tampão específico da enzima de restrição durante 30 minutos a 25 °C, para equilibrar a solução, e, após esse período, foi incubado com 20 U da endonuclease de restrição *Sma*I (Quatro G. Ltda.), preparada em seu próprio tampão de acordo com as instruções do fabricante e incubada durante 2 horas a 25 °C. O bloco de agarose contendo o DNA cromossômico foi fundido a 72 °C e aplicado nos poços do gel de corrida, preparado com 1,2% (p/v) de agarose (Agargen) em tampão TBE (Sigma-Aldrich®) 0,5 X (pH 8,4). Padrões de massa moleculares conhecidos de Lambda *Ladder PFG Marker* (New England Biolabs) foram utilizados para avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA no primeiro e no último poços do gel.

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

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

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

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

A análise dos perfis de fragmentação das amostras foi realizada pela inspeção visual; a análise automatizada foi realizada com auxílio do programa “Bionumerics”, Versão 7.1 (Applied Maths, Belgium). Os percentuais de similaridade dos perfis de fragmentação foram estimados pelo Coeficiente de *Dice*. Foram gerados dendrogramas utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) com otimização de 0,5% e tolerância de 1%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Enterococcus* spp. isolados a partir de amostras fecais de pinguins-de-magalhães

O pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é a espécie de pinguim mais abundante nas regiões temperadas; apesar disso, enfrenta sérias ameaças e encontra-se, atualmente, em declínio populacional (Birdlife, 2015; IUCN, 2015). Por tratar-se de uma espécie migratória, tanto animais jovens quanto adultos abandonam as suas colônias após o período de muda e reprodução e se deslocam por correntes oceânicas à procura de alimento (Mader et al., 2010; CECLIMAR, 2015).

Em virtude disso, entre os meses de março e setembro, os pinguins seguem as águas mais frias e ricas em nutrientes da corrente das Malvinas e, conseqüentemente, muitas dessas aves atingem as águas da plataforma continental do sul do Brasil (Putz et al., 2007; Mader et al., 2010; CECLIMAR, 2015). Dessa forma, muitos pinguins-de-magalhães são encontrados no Litoral Norte do RS, como foi evidenciado neste trabalho.

Conforme dados do CECLIMAR a respeito das amostras (Tabela 6), os pinguins-de-magalhães avaliados neste estudo foram encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, distribuídos nas praias de Arroio do Sal, Capão da

Canoa, Cidreira, Torres e Xangri-lá, no período de novembro de 2012 a outubro de 2013.

A classe etária desses pinguins era predominantemente juvenil, à exceção de um dos pinguins (P6), que era adulto (Figura 4a). Mader et al. (2010) salientam que a maioria das carcaças de pinguins encontradas no litoral do Rio Grande do Sul pertence a indivíduos jovens. Uma justificativa para isso é a maior amplitude das movimentações dessa classe etária no Atlântico, sendo os jovens mais encontrados no Brasil, enquanto os adultos permanecem no Uruguai e na Argentina. A inexperiência dos pinguins jovens também os torna mais vulneráveis, pois deixam os ninhos em busca de independência e de alimento e acabam se perdendo dos grupos e enfrentando situações de estresse, o que contribui também para o aparecimento de um grande contingente desses animais debilitados ou mortos nas praias (Mader, 2010).



FIGURA 4. Dois exemplares de pinguins pertencentes à espécie *Spheniscus magellanicus* encontrados durante os monitoramentos nas praias de Cidreira e Capão da Canoa, respectivamente, no Litoral Norte do Rio Grande do Sul; (a) amostra P6 (3267) e (b) amostra P9 (AM 687). Fonte: Arquivo CECLIMAR (2013).

Em relação ao estado físico dos pinguins avaliados no presente estudo, sete foram encontrados vivos, debilitados ou petrolizados e dois (P5 e P9) foram encontrados mortos, mas ainda frescos, com a carcaça intacta e com boa aparência corporal (conforme Figura 4b), sob o grau de decomposição *Code 2* (Geraci, 2005).

Outros estudos destacam que muitos espécimes de pinguins-de-magalhães têm sido encontrados no litoral do RS mortos ou bastante debilitados e petrolizados. Entre as principais causas para essa situação estão a redução na abundância de presas devido à pesca comercial, a contaminação por óleo e as mudanças climáticas (Boersma, 2008).

Segundo Mader et al. (2010), os pinguins encontrados mortos na costa brasileira são, em sua maioria, “náufragos” enfraquecidos e com problemas de saúde que seriam, de certo modo, um excedente populacional. Entretanto, esses animais são afetados pela escassez de presas devido à pesca comercial e pela crescente poluição química e biológica dos mares, principalmente, por petróleo, uma vez que a rota atlântica dessas aves coincide com a rota petrolífera (García-Borboroglu et al., 2006). O aquecimento global tem acarretado um aumento da frequência e da gravidade dos eventos *El Nino* sob as populações de pinguins-de-magalhães. Sendo assim, o clima também pode ser um fator importante na distribuição e na abundância de pinguins, muitas vezes desempenhando um papel fundamental na determinação da produtividade e na abundância de presas (Boersma, 2008). Estima-se que 19.500 pinguins são anualmente encontrados mortos na costa sul do Brasil; desses, quase 7.000 morrem devido a fatores antrópicos e climáticos (Mader et

al., 2010). Estudos com esses animais poderiam fornecer subsídios para ações futuras visando à sua proteção e à do ambiente marinho (Mader et al., 2010).

Nesse sentido, o presente estudo avaliou onze suabes contendo amostras de fezes de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), das quais nove apresentaram crescimento com características compatíveis com bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* e duas amostras não apresentaram crescimento bacteriano. Apesar de o trato gastrointestinal dos animais ser um ambiente rico em nutrientes e com temperatura relativamente constante, representando um dos maiores reservatórios de enterococos, os níveis de recuperação desses micro-organismos podem ser baixos (Lebreton et al., 2014).

Outros estudos que buscavam isolar enterococos de amostras de fezes de animais marinhos também não conseguiram isolar este gênero de todas as amostras. Layton et al. (2010) rastreou enterococos como indicadores da qualidade de águas recreativas na Califórnia (EUA), isolou este gênero de somente 57% (8/14) dos leões-marinhos e de 55% (12/22) das gaivotas avaliadas. Enterococos também foram isolados de somente 57,6% (144/ 250) amostras de fezes de equinodermos na Ilha de Açores em Portugal (Marinho et al., 2013). Santestevan (2014) avaliou a presença de enterococos em amostras de fezes de lobos-marinhos encontrados no Litoral Norte do RS e obteve enterococos de 80% (8/10) das amostras.

Neste estudo, as nove amostras que apresentaram crescimento de enterococos foram identificadas como P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9. De cada amostra, foram selecionadas aleatoriamente 30 colônias bacterianas.

Entretanto, apenas as bactérias que foram capazes de crescer em caldo Azida Dextrose, em BHI acrescido de 6,5% NaCl, hidrolisaram esculina na presença de sais biliares, apresentaram resultado negativo para o teste da catalase, cresceram a 45 °C e eram cocos Gram-positivos, características típicas de enterococos (Muray, 1990; Teixeira et al., 2011), seguiram no estudo.

A partir das nove amostras fecais de pinguins-de-magalhães, foi possível isolar 172 enterococos: vinte e dois isolados da amostra de fezes do pinguim 1 (P1), dezoito isolados da amostra P2, vinte e um isolados da P3, vinte isolados da P4, dezenove isolados da P5, dezessete da isolados P6, dezoito isolados da P7, dezessete isolados da P8 e vinte isolados da amostra P9, conforme a tabela abaixo.

TABELA 6. Informações referentes às amostras utilizadas no estudo.

Animal	Município	Data da coleta	Estado físico	Motivo da baixa	Classe etária	Amostra	Nº de isolados
3029	Cidreira	02/11/12	Vivo	Debilitado	Juvenil	P1	22
3050	Xangri-lá	13/11/12	Vivo	Petrolizado	Juvenil	P2	18
3156	Arroio do Sal	15/02/13	Vivo	Debilitado	Juvenil	P3	21
3057	Torres	20/11/12	Vivo	Debilitado	Juvenil	P4	20
-	Cidreira	27/06/13	Morto	-	Juvenil	P5	19
3267	Capão da Canoa	09/09/13	Vivo	Petrolizado	Adulto	P6	17
3276	Capão da Canoa	19/09/13	Vivo	Debilitado	Juvenil	P7	18
3290	Cidreira	14/10/13	Vivo	Debilitado	Juvenil	P8	17
AM 687	Cidreira	16/10/13	Morto	-	Juvenil	P9	20

#### 4.2 Confirmação do gênero pela detecção do gene *tuf*

A confirmação do gênero foi realizada por meio de PCR gênero-específico para verificar a presença do gene *tuf*. A análise da presença do gene *tuf* permite detectar espécies enterocócicas com excelente sensibilidade e

especificidade (Ke et al., 1999). Neste estudo, verificou-se que todos os 172 isolados apresentavam o fragmento de DNA de 112 pb, correspondente ao gene *tuf*. Na figura abaixo, é possível observar alguns representantes de cada amostra.

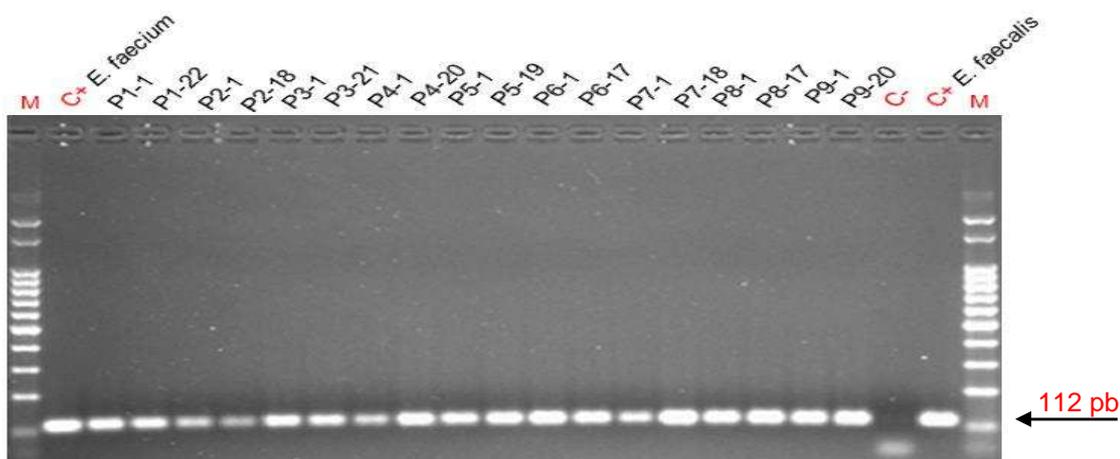


FIGURA 5. Fragmentos de DNA de 112 pares de base, correspondente ao gene *tuf* amplificado pela reação de PCR, em gel de agarose 1,5%. Controles: (C+) *E. faecium* SS1274, (C+) *E. faecalis* ATCC 29212 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular 100 pb. Fonte: A autora.

### 4.3 Identificação das espécies por meio de testes fisiológicos

#### e PCR convencional

Os 172 isolados foram submetidos ao PCR convencional utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para algumas espécies comumente relatadas na literatura em amostras ambientais: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (Byappanahalli et al., 2012; Ryu et al., 2013; Lebreton et al., 2014). Dos 172 isolados avaliados neste estudo, 132 (76,7%) apresentaram amplificação compatível para as espécies testadas, sendo que 74 (43%) isolados amplificaram o fragmento de DNA de 475 pb esperado para a espécie *E. faecalis* e 58 (33,7%) isolados amplificaram o

fragmento de DNA de 658 pb esperado para a espécie *E. faecium*. No presente estudo, não foram encontradas as espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

Destes 74 isolados identificados com *E. faecalis*, 18 pertenciam à amostra P2; 19, à amostra P5; 18, à amostra P8; e 20, à amostra P9. Já dos 58 *E. faecium*, 21 isolados pertenciam à amostra P3; 20 isolados, à amostra P4; e 17 isolados, à amostra P6.

Os 40 (23,3%) isolados bacterianos que não foram identificados por meio dessas reações de PCR, pertencentes às amostras P1 e P7, foram submetidos, posteriormente, a testes fisiológicos de acordo com Teixeira et al. (2011). Os 22 isolados da amostra P1 foram identificados por meio das provas bioquímicas como *E. hirae* atípico e os 18 da amostra P7 como *E. mundtii* atípico, como pode ser observado na Tabela 7.

TABELA 7. Perfil fisiológico atípico dos enterococos não identificados por PCR pertencentes às amostras P1 e P7.

Espécie	Características fisiológicas <sup>a</sup>											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	SAC	PIR	MGP	TEL	MOT	PIG
<i>E. hirae</i> <sup>I</sup>	-	-	+		-	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i> <sup>II</sup>	-	-	+		-	<sup>b</sup> -	+	-	-	-	-	-
<i>E. mundtii</i> <sup>I</sup>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>E. mundtii</i> <sup>III</sup>	+	-	+	+	-	<sup>b</sup> -	+	<sup>b</sup> -	-	-	-	+

<sup>a</sup> MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; SAC, sacarose; PIR, piruvato; MGP, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo; TEL, telurito de potássio, MOT, motilidade; PIG, pigmento.

<sup>b</sup> Características atípicas.

<sup>I</sup> Perfil fisiológico segundo Teixeira et al. (2011).

<sup>II</sup> Perfil fisiológico atípico encontrado na amostra P1(22 isolados).

<sup>III</sup> Perfil fisiológico atípico encontrado na amostra P7 (18 isolados).

Características atípicas são rotineiramente encontradas em algumas cepas e foram relatadas em outros trabalhos que analisaram enterococos de

amostras de fezes de animais marinhos (Santestevan, 2014; Spence, 2014) e em estudos com enterococos de origem clínica ou de alimentos (Resende, 2012; Prichula et al., 2013). Esses perfis atípicos podem ser explicados, pelo menos em parte, pela adaptação metabólica dos micro-organismos aos diferentes substratos oferecidos (Fracalanza, 2007; Prichula et al., 2013).

Em virtude disso, recomenda-se a associação de análises fenotípicas e genotípicas a fim de se evitarem estimativas errôneas (Teixeira et al., 2011; Santestevan, 2014). Dessa forma, com base nos resultados obtidos nas identificações por testes fisiológicos, foi realizado PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos para confirmar se os isolados das amostras P1 e P7 pertenciam mesmo às espécies *E. hirae* e *E. mundtii*, respectivamente (conforme Figura 6).

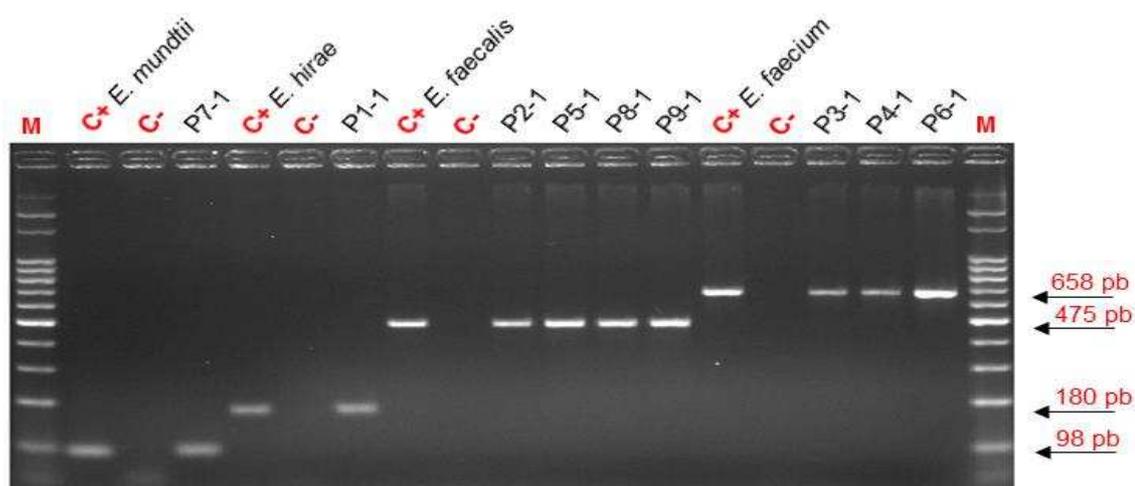


FIGURA 6. Fragmentos de DNA de 98 pb, 180 pb, 475 pb e 658 pb, correspondentes às espécies *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente, amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1,5%. Controles: (C+) *E. mundtii* J5 (C+) *E. hirae* C10, (C+) *E. faecalis* ATCC 29212, (C+) *E. faecium* SS1274 e (C-) sem DNA. M = marcador molecular de 100 pb. Fonte: A autora.

A partir desses resultados, verificou-se que a espécie predominante nas amostras avaliadas foi *E. faecalis*, com 43% (74/ 172); seguida de *E.*

*faecium*, com 33,7% (58/ 172); *E. hirae*, com 12,8% (22/ 172); e *E. mundtii*, com 10,5% (18/ 172), conforme Figura 7.

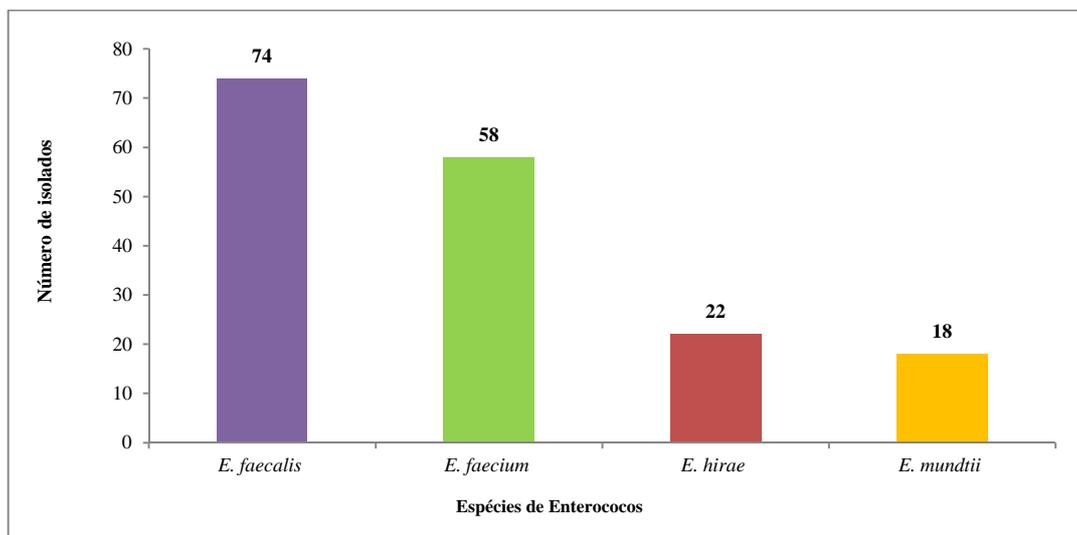


FIGURA 7. Distribuição de espécies de enterococos da microbiota intestinal de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Fonte: A autora.

A alta prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* no trato gastrointestinal dos pinguins-de-magalhães está de acordo com dados da literatura que salientam a prevalência dessas duas espécies no trato gastrointestinal humano e de outros animais (Mundt, 1963; Poeta et al., 2005; d’Azevedo et al., 2006; Teixeira et al., 2011; Cassenego et al., 2011; Lebreton et al., 2014). *Enterococcus hirae* é uma espécie encontrada em muitos hospedeiros animais, mas com menos frequência em humanos e tem sido associada a condições patológicas, particularmente em espécies aviárias, sendo responsável por causar septicemia e necrose no cérebro de frangos recém-nascidos e casos de septicemia em psitacíformes (Devriese et al., 1995). Já a presença de *E. mundtii* nas amostras de fezes dos pinguins pode estar

associada à dieta, uma vez que essa espécie é comumente isolada de fontes vegetais (Fisher & Phillips, 2009).

O trato gastrointestinal dos pinguins-de-magalhães avaliados neste estudo apresentou como espécie dominante *E. faecalis*, seguida por um grande número de *E. faecium*, diferentemente do que ocorre comumente em humanos e grande parte dos mamíferos, em que o percentual de colonização por *E. faecium* é bem inferior. A alta frequência encontrada no presente estudo para *E. faecium* está de acordo com vários trabalhos, os quais demonstram o predomínio ou a alta frequência de *E. faecium* no trato gastrointestinal de aves.

Klibi et al. (2014) avaliaram amostras de fezes de 111 aves (66 residentes, 45 migratórias) na Tunísia. Setenta e três enterococos foram recuperados das 111 amostras avaliadas, sendo *E. faecium* a espécie mais prevalente (82,2%), seguida por *E. faecalis* (8,2%), *E. casseliflavus* (4,1%), *E. gallinarum* (4,1%) e *E. durans* (1,4%). Radhouani et al. (2012) avaliaram 42 amostras de fezes de urubu em Portugal e obtiveram enterococos em 31 amostras fecais avaliadas. *E. faecium* foi a mais prevalente das espécies detectadas em urubus (48,4%), seguida por *E. faecalis* (16,1%), *E. hirae* (12,9%), *E. durans* (12,9%) e outras espécies.

Em estudo realizado com amostras do conteúdo intestinal de 775 carcaças de frango e 680 amostras de fezes de frangos de corte na Bulgária, 520 enterococos foram isolados. A maioria dos enterococos pertencia à espécie *E. faecium* (87,3%), seguida por *E. faecalis* (4%), depois por *E. durans* (1,45%) e de outras espécies em menor número (Urumova et al., 2005).

Nowakiewicz et al. (2014), verificaram a ocorrência e a distribuição de enterococos em fezes de animais selvagens e domésticos; entre estes, 12 frangos, na Polônia. A maioria dos enterococos pertencia à espécie *E. faecium*, seguida por *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *E. durans*.

Apesar de haver poucos estudos que envolvam enterococos isolados a partir de animais marinhos, as espécies que foram isoladas do trato gastrointestinal dos pinguins-de-magalhães neste trabalho também foram encontradas em outros estudos ambientais. Isto evidencia a ampla distribuição do gênero no ambiente marinho e em diferentes animais e localizações geográficas.

Ferguson et al. (2005) investigou a distribuição de enterococos em 1361 amostras de água e sedimentos marinhos no sul da Califórnia. As espécies predominantes também foram *E. faecalis* (34,4%), *E. faecium* (22,6%), *E. hirae* (10,9%), *E. casseliflavus* (8,9%), *E. mundtii* (4%), seguidas de outras espécies. Já Santestevan (2014) avaliou amostras fecais de oito lobos marinhos encontrados no Litoral Norte do Rio grande do Sul e obteve 160 enterococos. A espécie mais frequente foi *E. faecalis* (50,62%), seguida de *E. hirae* (34,37%), *E. casseliflavus* (11,87%), *E. gallinarum* (1,87%), *E. mundtii* (0,62%) e *E. faecium* (0,62%).

Barros et al. (2011) avaliaram a presença de enterococos em amostras fecais de uma espécie de peixe (*Sparus aurata*) capturada no Oceano Atlântico, na costa de Portugal, e observaram somente duas espécies de enterococos: *E. faecium*, que se mostrou predominante entre os isolados (91,8%), seguida de 8,2% de *E. faecalis*. Marinho et al. (2013) isolaram

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

Bennani et al. (2012) avaliaram amostras de água do mar, mariscos e sedimentos de três regiões com diferenças geográficas, populacionais e ecológicas da costa mediterrânea do Marrocos. Houve diferenças na prevalência de espécies de enterococos, dependendo do ponto e da amostra analisados, e dos 370 enterococos isolados, diferentemente do nosso estudo, *E. faecium* foi a espécie mais frequente, seguida por *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* e outros *Enterococcus* spp..

Lu et al. (2008) ressaltam que pouco se sabe sobre a composição da microbiota intestinal das comunidades de aves aquáticas; contudo, os estudos com esses animais têm demonstrado que essas aves podem ser consideradas fontes de disseminação de micro-organismos devido ao seu hábito alimentar e ao caráter migratório. Desse modo, elas podem difundir patógenos pelas suas fezes em diversos ambientes terrestres e aquáticos. Em contrapartida, Layton et al. (2010) salientam que a detecção de enterococos em amostras de ambientes marinhos pode fornecer informações sobre a origem fecal e mesmo sobre a qualidade das águas recreativas, mas não é suficiente para inferir sobre riscos à saúde ou mesmo associar determinada espécie à análise das condições desses ambientes.

Os dados gerados a partir desses estudos envolvendo enterococos e os ecossistemas marinhos sugerem que algumas espécies parecem ser

componentes naturais de ambientes marinhos, seja da água, de sedimentos, ou mesmo de animais. Contrastes na ocorrência e na prevalência de espécies de enterococos podem estar relacionados uma série de fatores, tais como a idade, estado de saúde, a composição da dieta e/ou o caminho migratório percorrido pelo animal ao longo da vida (Cassenego et al., 2013; Lebreton et al., 2014).

#### **4.4 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

Os resultados do perfil de suscetibilidade das espécies de enterococos obtidas de pinguins-de-magalhães demonstraram uma elevada frequência de isolados suscetíveis aos antimicrobianos testados. Entre os 172 enterococos avaliados, 66,3% (114/172) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Resultados semelhantes a esses foram relatados por Santestevan (2014), que verificou que 58,13% (93/160) dos enterococos, obtidos de lobos-marinhos do Litoral Norte do RS foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Em contrapartida, Marinho et al. (2013) demonstraram que cerca de apenas 20% (26/144) dos enterococos isolados de equinodermos das Ilhas de Açores foram suscetíveis aos antimicrobianos testados.

Conforme verificado na Tabela 8, todos os isolados foram suscetíveis a pelo menos 6 (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, nitrofurantoína e vancomicina) dos 10 antimicrobianos testados. Contudo, fenótipos de resistência foram encontrados para ciprofloxacina

(28,5%; 49/172), eritromicina (25%; 43/172), norfloxacina (14,5%; 25/172) e tetraciclina (4,6%; 8/172).

TABELA 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies de *Enterococcus* spp. isoladas de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Ag. Antimic. <sup>a</sup>	Espécies de enterococos								
	<i>E. faecalis</i> (n= 74)			<i>E. faecium</i> (n= 58)			<i>E. hirae</i> (n= 22)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP	74	-	-	58	-	-	22	-	-
CLO	74	-	-	58	-	-	22	-	-
EST	74	-	-	58	-	-	22	-	-
GEN	74	-	-	58	-	-	22	-	-
NIT	74	-	-	58	-	-	22	-	-
VAN	74	-	-	58	-	-	22	-	-
CIP	68	6	-	16	21	21	21	1	-
ERI	72	2	-	17	41	-	22	-	-
NOR	69	5	-	38	5	15	22	-	-
TET	74	-	-	54	-	4	18	-	4

<sup>a</sup> Agentes Antimicrobianos; AMP, ampicilina; CLO, cloranfenicol; EST, estreptomicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; VAN, vancomicina; CIP, ciprofloxacina; ERI, eritromicina; NOR, norfloxacina; TET, tetraciclina.

Assim como neste estudo, Santestevan, (2014) verificou que propriedades de resistência foram mais frequentemente encontradas para eritromicina (21,25%), nitrofurantoína (15,62%), tetraciclina (6,25%), norfloxacina (3,12%) e ciprofloxacina (3,12%) em enterococos isolados das amostras fecais de lobos-marinhos no Litoral Norte do RS. Marinho et al. (2013) encontraram percentagens mais elevadas de resistência para eritromicina (31,3%), ampicilina (29,9%), tetraciclina (29,2%) e ciprofloxacina (25,7%) nos enterococos isolados de equinodermos das Ilhas de Açores.

Barros et al. (2011) verificaram a presença de *Enterococcus* em amostras fecais de uma espécie de peixe (*Sparus aurata*) capturado na costa de Portugal e observaram percentuais significativos de resistência para

eritromicina (58,9%) e tetraciclina (17,8%). Outros estudos que avaliavam a qualidade da água de praias recreativas também demonstraram elevados percentuais de resistências a diversos antimicrobianos utilizados comumente na clínica médica e veterinária, confirmando a ocorrência de resistência em ecossistemas marinhos (Bennani et al., 2012; Dada et al., 2013; Ahmad et al., 2014).

A análise dos perfis de resistência, de acordo com as espécies de enterococos, demonstrou que, assim como no trabalho de Santestevan (2014), os isolados da espécie *E. mundtii* deste estudo foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. Observaram-se também percentuais menos elevados de resistência para as espécies *E. faecalis* e *E. hirae*. Constatou-se que 18,2% (4/22) dos *E. hirae* apresentaram resistência à tetraciclina e 4,5% (1/22), resistência intermediária à ciprofloxacina. Os *E. faecalis* apresentaram 8,1% (6/74) resistência intermediária à ciprofloxacina; 6,8% (5/74), à norfloxacina; e 2,7% (2/74), à eritromicina.

Em contrapartida, elevados percentuais de resistência foram detectados entre os isolados de *E. faecium*. Cerca de 72% (42/58) dos isolados de *E. faecium* apresentaram fenótipos de resistência à ciprofloxacina; 70,7% (41/58), à eritromicina; 34,5% (20/58), à norfloxacina; e 6,9% (4/58), à tetraciclina. Além disso, 70,7% (41/58) dos *E. faecium* apresentaram propriedades de resistência a duas ou mais diferentes classes de antimicrobianos, sendo considerados multirresistentes. Bactérias multirresistentes têm sido relatadas também em outros estudos com animais marinhos (Barros et al., 2011; Santestevan, 2014), demonstrando que este

fenótipo de resistência combinada, comumente encontrado em enterococos clínicos e de alimentos, tem sido encontrado em isolados ambientais (Wright, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os dados descritos por Barros et al. (2011), que também obtiveram percentuais expressivos de resistência a eritromicina (59,7%), tetraciclina (14,9%) e ciprofloxacina (4,5%) envolvendo *E. faecium* obtidos de peixe (*Sparus aurata*) capturados na costa de Portugal. Além disso, 25,4% (17/67) desses isolados *E. faecium* mostraram-se também resistentes a dois ou mais antimicrobianos. De acordo com os autores, a poluição da água com antimicrobianos pode ser um fator que contribuiu para a detecção dessa resistência. Barros et al. (2011) salientam, ainda, que o peixe (*S. aurata*) é um reservatório de *Enterococcus* resistentes, sendo esse um problema de saúde ecológica que exige o estabelecimento de políticas para a prudência no uso de antimicrobianos nos diversos ecossistemas, uma vez que esses agentes livres no ambiente aquático podem trazer riscos para a saúde animal e humana (Barros et al., 2011).

Marinho et al. (2013) destacam também elevados percentuais de resistência em *E. faecium* obtidos de equinodermos coletados de águas de Açores, Portugal. Cerca de 33% (40/120) foram resistentes à eritromicina; 31,7% (38/120), à tetraciclina; 30,8% (37/120), à ciprofloxacina; e 29% (35/120), à ampicilina. O estudo ressalta que os dados encontrados são essenciais para melhorar o conhecimento sobre a disseminação de cepas resistentes por meio dos ecossistemas marinhos e as possíveis implicações

envolvidas na transferência dessas resistências para outros animais ou para humanos (Marinho et al.,2013).

Enterococos resistentes a antimicrobianos em reservatórios não humanos são cada vez mais frequentes na medida em que são realizados estudos nessa direção. Contudo, a contribuição desses agentes biológicos para a disseminação da resistência ainda é muito discutida (Santestevan, 2014).

O fluxo de bactérias resistentes e de genes de resistência de animais selvagens permanece ainda pouco compreendido (Klibi et al., 2014). Todavia, Radhouani et al. (2011) salientam que aves migratórias, que voam e/ou percorrem longas distâncias, parecem atuar como transportadoras, ou como reservatórios, de bactérias resistentes e podem ter um papel epidemiológico importante na disseminação da resistência.

Fluidos biológicos, tais como urina e fezes, oriundos de seres humanos e animais, contaminados com micro-organismos resistentes a antimicrobianos, são liberados no esgoto, principalmente em águas residuais provenientes de hospitais e instalações de agricultura intensiva (Baquero et al., 2008). Assim, os efluentes urbanos seriam uma forma de disseminar bactérias resistentes em águas marinhas, de forma a contaminar os animais que habitam esses ambientes (Kümmerer, 2009a). A presença de micro-organismos resistentes em efluentes de esgoto tratado e a transmissão dessa resistência para isolados encontrados no trato gastrointestinal de peixes têm sido estudadas como potenciais bioindicadores de poluição marinha (Al-Barhry et al. 2009; Barros et al. 2011).

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

Segundo Kümmerer (2009b), o impacto gerado pela presença de antimicrobianos no ambiente aquático e a frequência com que esses genes de resistência são transferidos ainda são um assunto questionável. O que se infere é que a entrada de micro-organismos resistentes no meio ambiente a partir de diferentes fontes é um ponto crítico para a seleção de linhagens resistentes na natureza e um risco potencial para a saúde humana e dos ecossistemas.

Portanto, características de resistência evidenciadas em ambientes marinhos podem ter surgido tanto a partir do contato com poluentes oriundos de ações antrópicas quanto podem ser atribuídas ao resistoma antimicrobiano. Os pinguins-de-magalhães avaliados neste trabalho não receberam qualquer tipo de tratamento medicamentoso e não estão, na natureza, em contato (direto) com compostos antimicrobianos. Acredita-se que a presença de

linhagens enterocócicas com traços de resistência encontradas neste trabalho pode ser estar relacionada, principalmente, ao resistoma ambiental.

Nesse sentido, Wright (2007) salienta que genes relacionados à resistência antimicrobiana podem ser constituintes genéticos naturais de muitas bactérias não patogênicas. Entre os elementos incluídos no resistoma estão todos os genes de resistência crípticos, que não são necessariamente expressos, e também genes precursores que codificam as proteínas com atividade de resistência moderada, os quais podem evoluir para genes de resistência efetiva, o que destaca a importância de pesquisas para o entendimento da evolução dos mecanismos de resistência (Wright, 2007).

#### **4.5 Presença dos genes *tet(L)*, *tet(M)* e *erm(B)* relacionados**

##### **à resistência bacteriana à tetraciclina e à eritromicina**

A caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são de grande importância para compreensão dos fatores envolvidos na resistência (Guimarães et al., 2010). Além disso, a alta frequência e diversidade de perfis antimicrobianos entre os isolados de enterococos e a determinação do perfil genético dos genes associados à resistência pode ser usado como ferramenta valiosa adicional para fins de epidemiologia e de estudos de tipagem molecular (Teixeira & Merquior, 2013).

Os genes *tet(M)* e *tet(L)* foram avaliados nos oito isolados que apresentaram resistência à tetraciclina, 4 isolados de *E. hirae* da amostra P1(1,

9, 15, 20), 2 isolados de *E. faecium* da amostra P4 (1,17) e 2 isolados de *E. faecium* da amostra P6 (7,15). Os resultados quanto à presença e ausência destes genes podem ser observados na tabela abaixo.

TABELA 9. Presença e ausência dos genes *tet(M)* e *tet(L)* em enterococos resistentes à tetraciclina isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

<b>Espécie</b>	<b>Isolados</b>	<b>Resistência à Tetraciclina (30µg)</b>	<b><i>tet(M)</i></b>	<b><i>tet(L)</i></b>
<i>E. hirae</i>	P1-1	RESISTENTE	1 <sup>a</sup>	1
<i>E. hirae</i>	P1-9	RESISTENTE	1	1
<i>E. hirae</i>	P1-15	RESISTENTE	1	1
<i>E. hirae</i>	P1-20	RESISTENTE	1	1
<i>E. faecium</i>	P4-1	RESISTENTE	1	1
<i>E. faecium</i>	P4-17	RESISTENTE	1	1
<i>E. faecium</i>	P6-7	RESISTENTE	1	0 <sup>b</sup>
<i>E. faecium</i>	P6-15	RESISTENTE	1	0
<b>Total</b>			<b>8</b>	<b>6</b>

<sup>a</sup>1 = presença; <sup>b</sup>0 = ausência

Os oito isolados avaliados apresentaram o gene *tet(M)*, enquanto o gene *tet(L)* estava presente em apenas seis desses isolados. Portanto, não estava presente nos isolados P6-7 e P6-15.

O gene *tet(M)* é o determinante de resistência mais comum entre os enterococos, é tipicamente cromossômico, mas pode ser carregado também pelo transposon Tn916 ou transposons conjugativos relacionados, bem como podem ser encontrados em plasmídeos conjugativos (Murray, 1990, Frazzon et al., 2010). Isso pode justificar a sua ampla distribuição entre os enterococos resistentes à tetraciclina encontrados neste estudo.

O gene *erm(B)* foi avaliado nos 43 isolados resistentes à eritromicina, em um *E. faecalis* da amostra P2 (7), nos 21 *E. faecium* da amostra P3, em 18 isolados de *E. faecium* da amostra P4 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15, 16, 18, 19, 20), em dois *E. faecium* da amostra P6 (7, 15) e em um *E. faecalis* da amostra P8 (17). Contudo, não foi possível detectar o gene *erm(B)* em nenhum dos isolados testados.

Um dos principais mecanismos de resistência envolvendo isolados de enterococos resistentes a macrolídeos é a modificação no sítio alvo de ação do antimicrobiano, devido a uma rRNA metilase codificada por genes *erm*. Apesar de o gene *ermB* ser o mais comumente encontrado entre isolados de enterococos de humanos e animais, outros genes *erm* (*erm(A)* e/ou *erm(C)*) podem estar envolvidos com a resistência à eritromicina evidenciada neste estudo (Murray, 1990; Kristich et al., 2014).

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

A resistência a antimicrobianos e os mecanismos implicados também foram avaliados em outros trabalhos com animais marinhos. Marinho et al. (2013) avaliou enterococos isolados de fezes de equinodermos. Percentagens elevadas de resistência em enterococos foram encontradas para eritromicina e tetraciclina, e os genes *erm(A)* ou *erm(B)*, *tet(M)* e/ou *tet(L)* foram

encontrados nos isolados resistentes a esses antimicrobianos (Marinho et al., 2013). Os genes *erm(B)*, *tet(M)* e/ou *tet(L)* foram reportados em outro estudo com *Enterococcus* isolados de amostras fecais de peixe (*Sparus aurata*) da costa de Portugal (Barros et al., 2011). Além disso, Santestevan (2014) também verificou a presença dos genes *erm(B)* e *tet(M)* em isolados de enterococos resistentes à eritromicina e à tetraciclina, respectivamente, obtidos de lobos marinhos.

#### **4.6 Detecção de genes de virulência por PCR**

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

Entre as principais moléculas associadas à virulência em enterococos estão a citolisina, a adesina de colágeno, a gelatinase e a substância de agregação (Eaton & Gasson, 2001; Coburn & Gilmore, 2003; Shankar et al., 2004; Medeiros et al., 2013). Todos enterococos isolados no presente estudo foram avaliados por PCR quanto à presença dos genes, *cyIA*,

*geE*, *ace* e *asa*, envolvidos com a virulência em enterococos. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Genes de virulência *cyIA*, *geE*, *ace* e *asa* encontrados nas diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

<b>Espécies (n<sup>o</sup>)</b>	<b><i>cyIA</i></b>	<b><i>geE</i></b>	<b><i>ace</i></b>	<b><i>asa</i></b>
<i>E. faecalis</i> (n=74)	0	74	74	61
<i>E. faecium</i> (n=58)	0	0	0	0
<i>E. hirae</i> (n=22)	0	0	0	0
<i>E. mundtii</i> (n=18)	0	0	0	0
<b>Total (172)</b>	<b>0</b>	<b>74</b>	<b>74</b>	<b>61</b>

n<sup>o</sup>= número de isolados de cada espécie

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

Essa ampla presença de fatores de virulência também foi verificada neste estudo, pois, dos 172 isolados, apenas os isolados pertencentes à espécie *E. faecalis* apresentaram os genes de virulência testados. A maior frequência observada foi para os genes *geE* e *ace*, com 43% (74/172), seguidos de *asa*, com 35,5% (61/172). O gene *cyIA* não foi encontrado nos isolados avaliados (conforme Tabela 10).

Em relação às amostras analisadas, verificou-se que os enterococos isolados de quatro das nove amostras avaliadas (P2, P5, P8 e P9)

apresentavam genes de virulência. Nessas quatro amostras (74 *E. faecalis*), todos os isolados apresentavam os genes *gelE* e *ace*, e apenas alguns isolados da amostra P2 (11 isolados) e P8 (2 isolados) não apresentavam o gene *asa*. A elevada frequência dos genes *gelE*, *ace* e *asa* na espécie *E. faecalis* corrobora a ideia de que essa espécie é capaz de abrigar diversos genes de virulência.

Apesar dos genes de virulência avaliados neste estudo terem sido encontrados apenas em *E. faecalis*, esses genes têm sido relatados em outras espécies de enterococos, como *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* (Eaton & Gasson, 2001; Poeta et al., 2005; Santestevan, 2014). Tendo em vista que os enterococos possuem mecanismos de transferência de genes altamente eficazes e que a maioria dos genes de virulência é conhecida por estar associada com alguns plasmídeos altamente transmissíveis, existe o risco de micro-organismos que carecem de genes de virulência terem adquirido esses genes por conjugação (Eaton & Gasson, 2001).

Santestevan (2014) detectou genes de virulência em diferentes espécies de enterococos. Entre 160 isolados obtidos de lobos-marinhos, 69,4% (111/160) apresentaram pelo menos um dos genes testados. Dos 81 *E. faecalis* isolados desse estudo, 93,8% (76/81) apresentaram o gene *ace*; 76,5% (62/81), o gene *gelE*; 11,1% (9/81), o *asa*; e 4,9% (4/81), o *cyIA*. Assim como neste trabalho, a espécie *E. faecium* obtida de lobos-marinhos não apresentou nenhum dos quatro genes relacionados à virulência.

Segundo Hancock et al., 2014, alguns estudos identificaram recentemente um outro gene que codificava um tipo de proteína de adesão da classe das MSCRAMMs em *E. faecium*. A proteína foi chamada de Acm (adesina de colágeno de *E. faecium*) e apresentava similaridade com Ace de *E. faecalis*; entretanto, é ainda mais similar com a proteína CNA de *S. aureus*. A ausência das proteínas de adesão avaliadas neste estudo entre os isolados de *E. faecium* pode ser justificada pela presença dessa proteína, uma vez que ela apresenta uma organização global muito semelhante à da proteína Ace. Todavia, diferentemente da Ace, a proteína Acm se liga apenas aos colágenos do tipo I e IV, não se ligando a laminina e dentina (Hancock et al., 2014).

Ahmad et al. (2014) avaliaram os genes de virulência entre enterococos obtidos de uma praia da Malásia. Verificaram diferenças significativas entre isolados de enterococos obtidos da água do mar e de amostras de água de um rio que desembocava nessa praia. Os genes, *gelE*, *asa*, *esp* e *cyfA*, foram detectados em 100%, 63,41%, 21,95% e 7,32%, respectivamente, entre os isolados do rio. Já entre os isolados da água da praia, em proporções menores de 67,27%, 41,82%, 20%, 0%, respectivamente. Ahmad et al. (2014) salientam que isolados positivos para estes determinantes de virulência em águas recreativas poderiam ser um risco para a saúde humana e de outros animais que habitam esses ambientes aquáticos.

Por outro lado, Santestevan (2014) ressalta que a presença de genes de virulência nem sempre implica risco à saúde do hospedeiro. A presença destes genes pode estar relacionada apenas ao aumento na

capacidade desses micro-organismos em se instalar e colonizar o trato gastrointestinal ou se propagar para outros nichos altamente competitivos.

#### 4.7 Relação entre a presença do gene *geE* e a produção da enzima gelatinase

Dos 172 isolados para os quais a atividade da enzima gelatinase foi investigada, somente os da espécie *E. faecalis* apresentaram atividade na frequência de 86,5% (64/74), como é possível verificar na Tabela 10. A tabela mostra a relação entre a presença do gene *geE* e a atividade gelatinolítica entre os isolados deste estudo.

TABELA 11. Relação entre a presença do gene *geE* e a atividade gelatinolítica entre as espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies	<i>geE</i> - /gelatinase -	<i>geE</i> + /gelatinase -	<i>geE</i> + /gelatinase +
	%/ n <sup>a</sup>	%/ n <sup>a</sup>	%/ n <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	0% (0/74)	13,5% (10/74)	86,5% (64/74)
<i>E. faecium</i>	100% (58/58)	0% (0/58)	0% (0/58)
<i>E. hirae</i>	100% (22/22)	0% (0/22)	0% (0/22)
<i>E. mundtii</i>	100% (18/18)	0% (0/18)	0% (0/18)

n<sup>a</sup>: número de isolados de cada espécie; (-): resultado negativo; (+): resultado positivo

Os isolados pertencentes às espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. mundtii* não apresentavam o gene *geE*, como já havíamos salientado anteriormente, tampouco produziram gelatinase. A atividade da gelatinase não foi detectada em 13,5% (10/74) dos *E. faecalis* positivos para o gene *geE*, o que demonstra que a presença de *geE* não está necessariamente

correlacionada com o fenótipo de gelatinase (Marra et al., 2007). Qin et al., (2000) verificaram também que, entre os *E. faecalis* que apresentavam o gene *ge/E*, apenas cerca de 60% produziam a gelatinase ativa.

O fato de as bactérias apresentarem o gene *ge/E* não estarem produzindo gelatinase pode ser explicado por inúmeros fatores, tais como a perda de atividade gelatinolítica em condições de laboratórios (Lopes et al., 2008) ou a possíveis deleções cromossômicas em regiões que portam o operon *fsr* composto dos genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* que regulam positivamente a expressão de gelatinase e serina protease poderem resultar em fenótipos negativos (Qin et al., 2000). Além disso, o gene *ge/E* pode estar silenciado por condições temporais, devido às condições estabelecidas no trato gastrointestinal, ao efeito do sinergismo da microbiota bacteriana, bem como pelos baixos níveis de *down regulation* da expressão gênica; ou, ainda, devido à influência de fatores ambientais que podem estar influenciando também na expressão da enzima (Eaton & Gasson, 2001).

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

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

A relevância de biofilmes formados por enterococos clínicos se deve principalmente ao fato de que, quando apresentam esse fenótipo, eles se tornam ainda mais resistentes à ação de antimicrobianos (Mohamed & Huang, 2007; Medeiros et al., 2013). Na indústria, biofilmes formados por enterococos associados a alimentos são um problema, uma vez que esses microorganismos podem aderir à superfície de equipamentos de processamento de alimentos, tornando-os fontes de contaminação, além de apresentarem uma maior resistência a sanitizantes (Cassenego et al., 2013; Fernandes et al., 2015).

Já as informações sobre a formação de biofilme por enterococos isolados do ambiente marinho ainda são escassas (Asmat et al., 2014). Com o intuito de ampliar os dados relativos a essa temática, os 172 enterococos deste estudo foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Os ensaios de formação de biofilme foram realizados por meio da adesão em microplacas de poliestireno e a classificação foi estabelecida conforme Stepanovic et al. (2000). Os resultados estão expressos na Tabela 12.

TABELA 12. Capacidade de formação de biofilme das diferentes espécies de enterococos isoladas de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

Espécies (n <sup>a</sup> )	Capacidade de formação de biofilme			
	Forte n <sup>a</sup> / (%)	Moderado n <sup>a</sup> / (%)	Fraco n <sup>a</sup> / (%)	Não formador n <sup>a</sup> / (%)
<i>E. faecalis</i> (74)	0 (0%)	30 (40,5%)	44 (59,5%)	0 (0%)
<i>E. faecium</i> (58)	0 (0%)	0 (0%)	15 (25,9%)	43 (74,1%)
<i>E. hirae</i> (22)	0 (0%)	16 (72,7%)	06 (27,3%)	0 (0%)
<i>E. mundtii</i> (18)	0 (0%)	0 (0%)	02 (11,1%)	16 (88,9%)
<b>Total (172)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>46 (26,7%)</b>	<b>67 (39%)</b>	<b>59 (34,3%)</b>

n<sup>a</sup>= número de isolados de cada espécie

Os enterococos avaliados se mostraram, na sua maioria, 39% (67/172), fracos formadores de biofilme; 34,3% (59/172), não formadores; e 26,7% (46/172) apresentaram moderada capacidade de formação de biofilme. Nenhum dos isolados avaliados foi classificado como forte formador de biofilme.

Moderada e fraca capacidade de formação de biofilme foram os fenótipos mais amplamente distribuídos entre as espécies *E. faecalis* e *E. hirae*. Cerca de 59% (44/74) dos *E. faecalis* foram fracos formadores e 40,5% (30/74), moderados formadores de biofilme; enquanto 72,7% (16/22) dos *E. hirae* foram considerados moderados formadores e 27,3% (6/22), fracos formadores de biofilme.

A distribuição dos fenótipos de biofilme entre as espécies *E. faecium* e *E. mundtii* mostrou que essas espécies foram fracas ou não formadoras de biofilme. A maioria dos *E. faecium* (74,1%; 43/58) e *E. mundtii* (88,9%; 16/18) não foi capaz de formar biofilme nas microplacas e 25,9% (15/58) dos *E. faecium* e 11,1% (2/18) *E. mundtii* foram considerados fracos formadores de biofilme.

Mohamed & Huang (2007), em uma revisão sobre biofilmes, destacam que *E. faecalis* produz biofilme mais frequentemente do que outras espécies de enterococos e que a formação de biofilmes pode ser um fator importante na patogênese por enterococos. A capacidade de enterococos de formar biofilme pode contribuir para a sobrevivência, para a persistência e para a dispersão de genes de virulência e/ou resistência em diversos nichos ambientais, bem como pode favorecer patogêneses nos diferentes

hospedeiros. Em contrapartida, Dunny et al. (2014) ressaltam que é necessário cautela ao se associar a formação de biofilme a patogêneses, uma vez que nem sempre os ensaios laboratoriais refletem de perto as condições de um hospedeiro humano ou animal.

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

Alguns autores sugerem também que a gelatinase pode contribuir para a formação de biofilme (Medeiros et al. 2013; Ahmad et al., 2014). Contudo, essa ainda é uma questão em aberto, pois outros estudos não verificaram correlação entre a expressão de gelatinase e a formação de biofilme (Mohamed & Murray, 2005; Marra et al., 2007).

A substância de agregação (Agg), codificada pelo gene *asa*, facilita a associação entre bactérias, aumentando a probabilidade de formação de um *quorum* de células de *E. faecalis* e, posteriormente, promovendo a expressão de fatores que são dependentes de sinais de *quorum-sensing* (Dunny et al., 2014). Alguns estudos salientam que a expressão do gene *agg* tem um efeito importante sobre a formação de biofilme, uma vez que promove a agregação

de microrganismos aderentes a uma superfície (Chuang-Smith et al., 2010; Dunny et al., 2014).

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

No presente estudo, não parece haver uma relação entre a presença dos genes *ge/E* e *asa* com a formação de biofilme, visto que os isolados de *E. hirae*, *E. faecium* e *E. mundtii* foram capazes de formar biofilme e não apresentavam nenhum desses genes. Diversos estudos têm salientado que esse fenótipo é multifatorial e depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam juntos. Além disso, vários outros genes, além dos estudados neste trabalho, têm sido relatados como importantes na formação de biofilme em enterococos, o que confirma a complexidade e a natureza multifatorial dessa característica (Chuang-Smith et al., 2010; Mohamed & Murray, 2005; Mohamed & Huang, 2007; Tsikrikonis et al., 2012; Cassenego et al., 2013; Asmat et al., 2014; Dunny et al., 2014).

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

O PFGE é reconhecido como padrão ouro para verificar a relação clonal de muitas linhagens de enterococos (Saeedi et al., 2002; Magalhães et al., 2005; Teixeira et al., 2011). Esse método de tipagem permite o estudo da disseminação dos enterococos em diferentes hospedeiros e ambientes. Além disso, auxilia na compreensão da estrutura populacional, da evolução de linhagens multirresistentes e virulentas, e da emergência e dispersão global de certos clones responsáveis por surtos causados por esse gênero (Camargo et al., 2008; d'Azevedo et al., 2008; Teixeira & Merquior, 2013).

Neste estudo a diversidade genética dos 172 enterococos isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães foi avaliada através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, utilizando a técnica da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE). A técnica revelou diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico distribuídos em 17 perfis clonais distintos e um *singleton*, formado por um perfil não relacionado aos demais, como pode ser observado na Figura 8.

O ponto de corte para considerar as bactérias como pertencentes ao mesmo perfil clonal foi de 80% de similaridade (Tenover, 1995). Cada um dos 17 perfis clonais foi constituído por enterococos de uma mesma espécie.

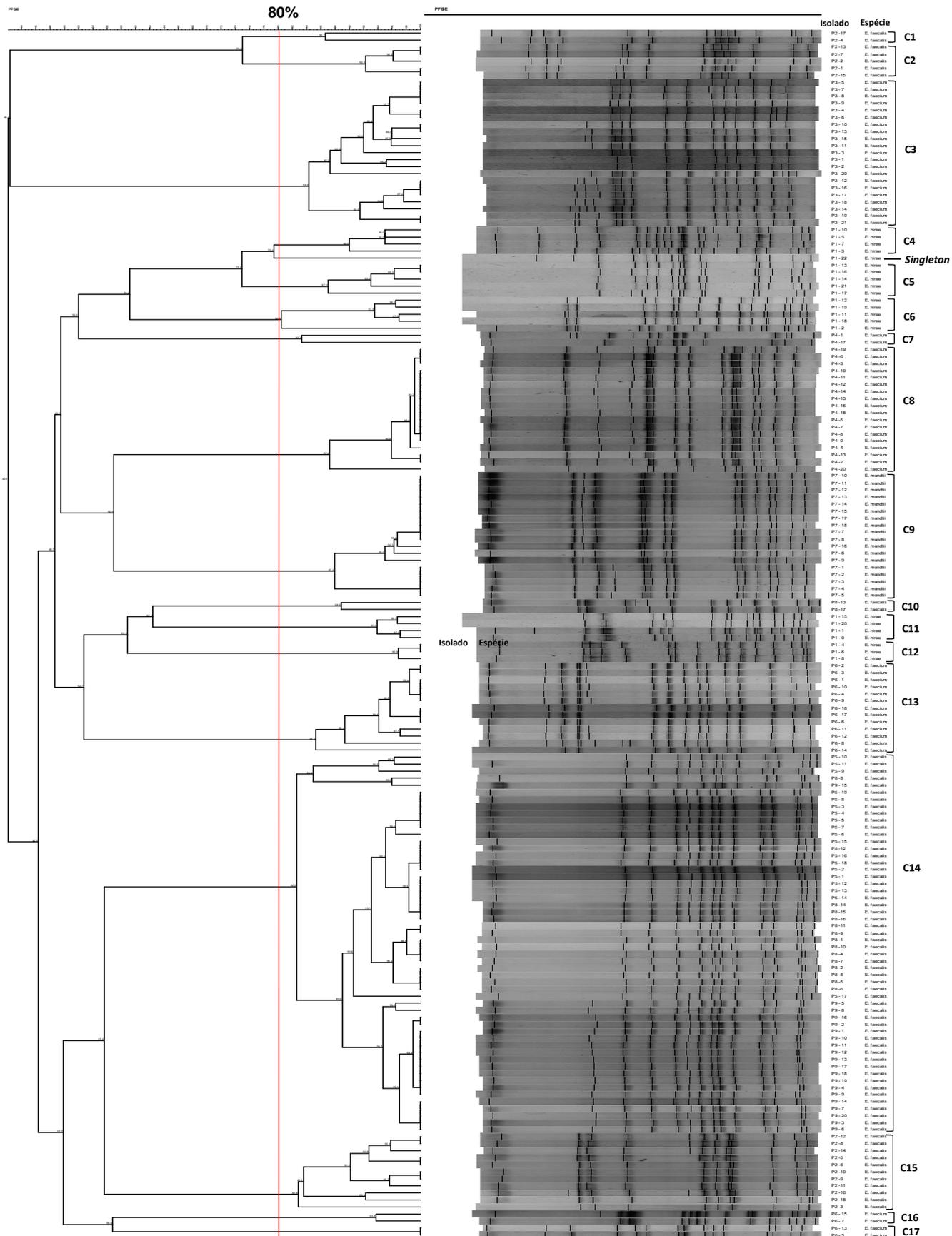


FIGURA 8. Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *Sma*I, dos enterococos isolados das amostras P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9. Fonte: A autora.

De acordo com o número de isolados que constituíam cada perfil clonal, observou-se que o perfil clonal 14 (C14) apresentou o maior número de isolados, constituído por 54 isolados de *E. faecalis*, sendo considerado, portanto, o principal clone deste estudo. O segundo perfil clonal que apresentou maior número de isolados foi o clone C3, com 21 isolados de *E. faecium*, seguido do clone C9, com 18 *E. mundtii*, e do clone C8, que continha 18 isolados de *E. faecium*. O perfil clonal 13 (C13) apresentou 13 *E. faecium*, o clone C15 continha 11 *E. faecalis*, o clone C2 apresentou cinco *E. faecalis* e os clones C5 e C6 continham cinco *E. hirae*.

Os perfis clonais 4 (C4) e 11 (C11) foram constituídos por quatro *E. hirae*, seguidos do clone C12, com três *E. hirae*, do clone C16 que continha dois *E. faecium*, dos clones C7 e C17 que apresentaram dois *E. faecium*, e dos clones C1 e C10 que foram constituídos por dois *E. faecalis*.

Detendo-se a uma análise mais minuciosa dos perfis obtidos de acordo com a técnica de PFGE, posteriormente, foram avaliados os dendrogramas gerados a partir das diferentes espécies de enterococos, a fim de comparar mais adequadamente a similaridade entre os isolados de uma mesma espécie.

Considerando-se a diversidade genética dentro de uma mesma espécie, analisando-se os 22 isolados da espécie *E. hirae* (amostra P1), pode-se verificar que foram encontrados cinco perfis clonais diferentes, C4, C5, C6, C11, C12 e um *singleton*, formado por um perfil não relacionado aos demais, cuja maior similaridade foi de 79,4% em relação ao perfil clonal 4 (Figura 9). Convém ressaltar que os quatro isolados de *E. hirae* do clone C11

apresentaram 93,9% de similaridade. Além disso, todos os isolados desse grupo foram resistentes à tetraciclina e portavam os genes *tet(M)* e *tet(L)*.

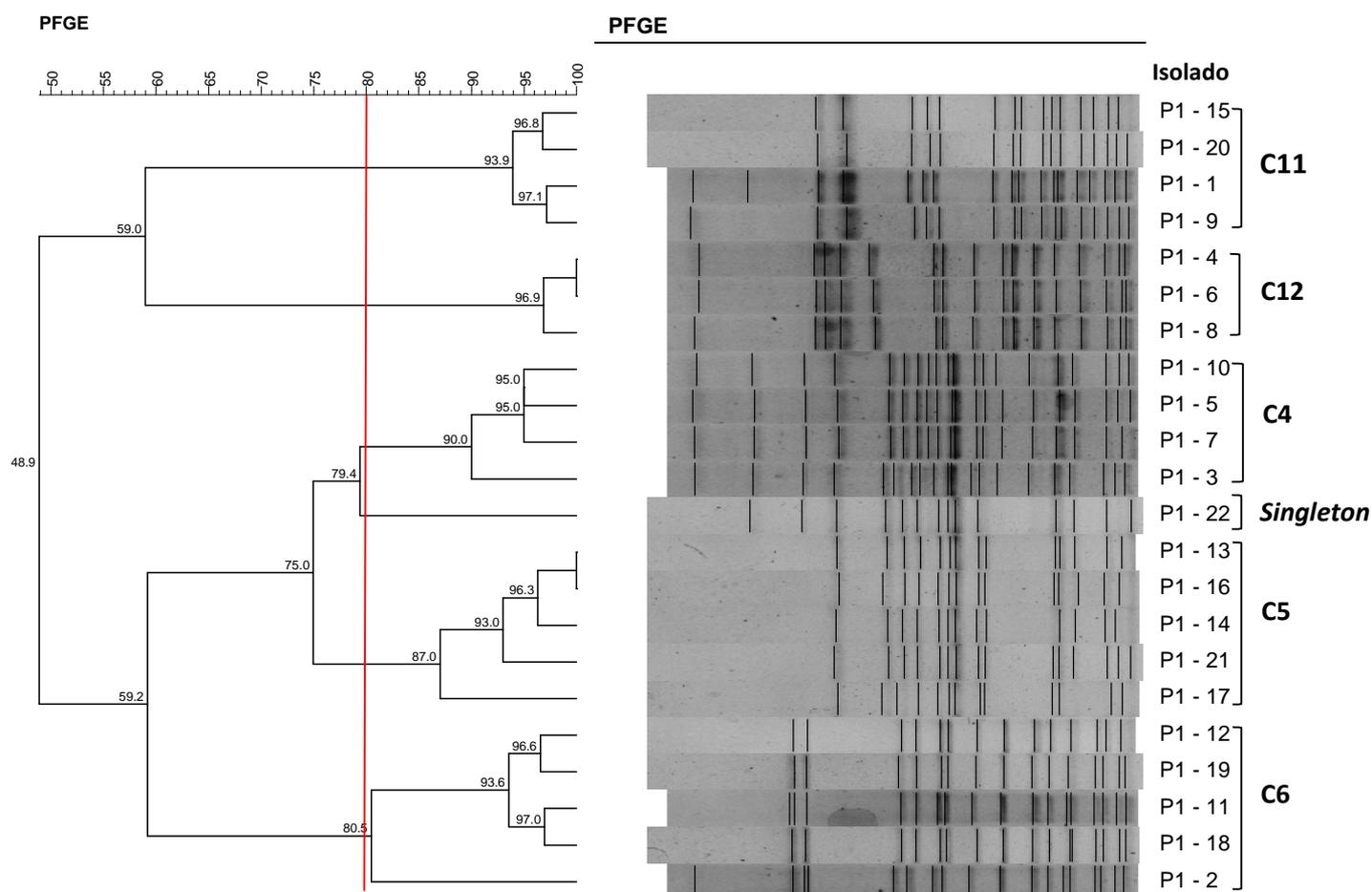


FIGURA 9. Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, dos isolados de *E. hirae* da amostra P1. Fonte: A autora.

Já em relação aos 18 isolados da espécie *E. mundtii* foi possível verificar que todos os isolados fazem parte de um mesmo perfil clonal (C9) com 87,9% de similaridade entre os isolados, conforme Figura 10. É importante salientar que nenhum dos isolados apresentou resistência aos antimicrobianos e os genes de virulência testados.

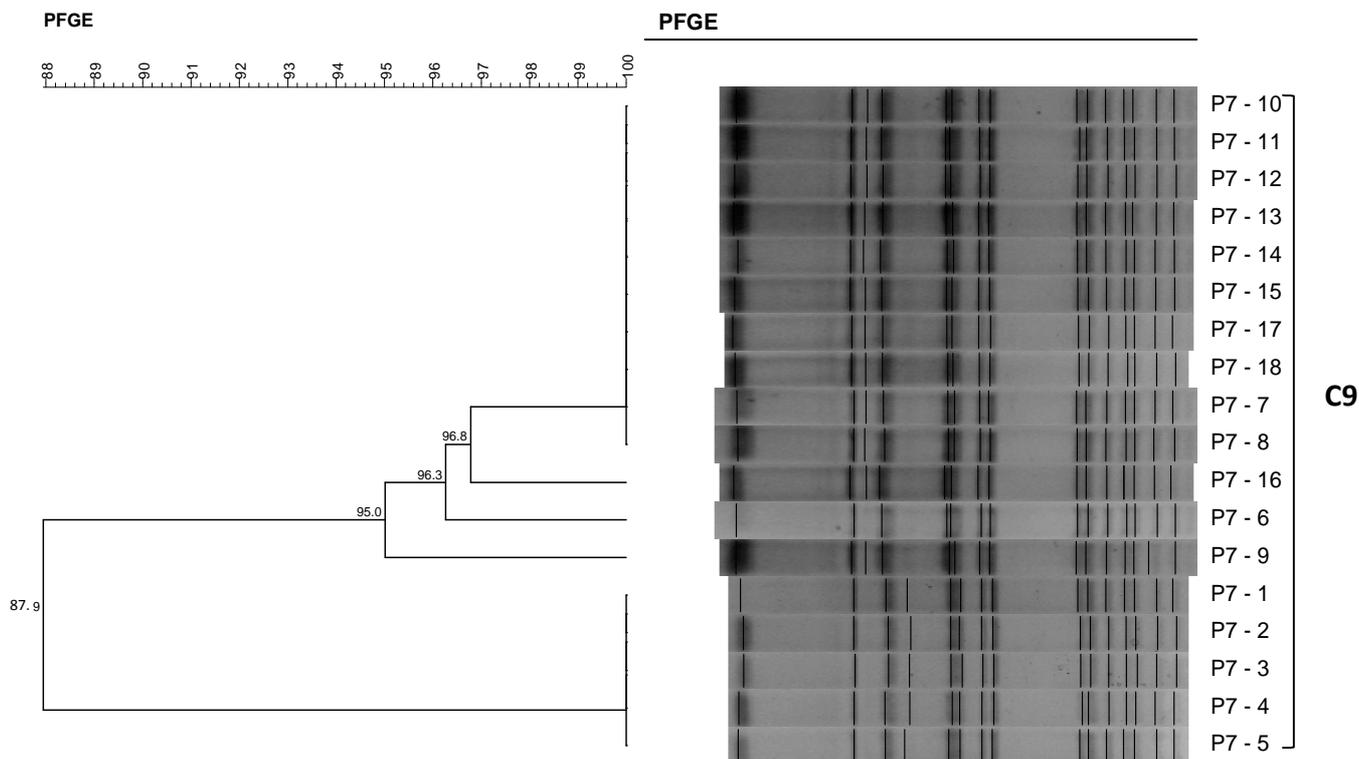


FIGURA 10: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, dos isolados de *E. mundtii* da amostra P7. Fonte: A autora.

Quanto à diversidade genética entre os 58 isolados de *E. faecium* pertencentes às amostras P3, P4 e P6, verificou-se que esses isolados constituíam seis perfis clonais diferentes (C3, C7, C8, C13, C16, C17), sendo o perfil clonal C3 estava representado pelo maior número de isolados relacionados, conforme representado na Figura 11. Uma característica importante evidenciada entre os *E. faecium* foi a resistência a diferentes antimicrobianos e isso pode ser correlacionado também com diferentes padrões de bandas formados nessa espécie.

Os isolados *E. faecium* P4-1 e P4-17 do clone C7 apresentaram 83,3% de similaridade, foram resistentes à tetraciclina e apresentavam os genes *tet(M)* e *tet(L)*. Os 13 isolados de *E. faecium* do clone C13 apresentaram 85,3% de similaridade e foram todos suscetíveis aos antimicrobianos testados, com exceção de um isolado (P6-9) que apresentou resistência intermediária a ciprofloxacina.

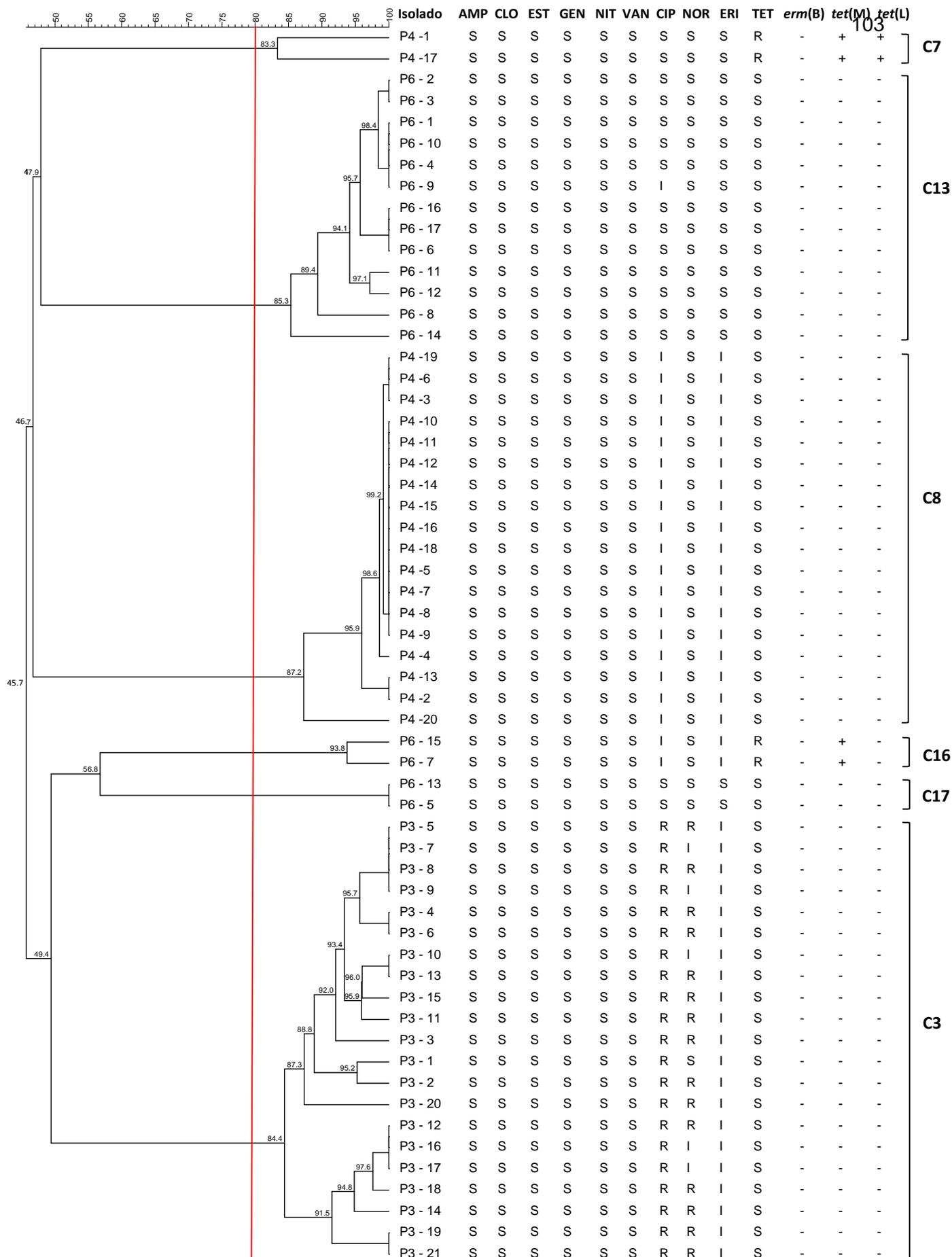


FIGURA 11. Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, perfil de resistência aos antimicrobianos e genes de resistência erm(B), tet(M) e tet(L), dos isolados de *E. faecium* das amostras P3, P4 e P6. Fonte: A autora.

Os *E. faecium* pertencentes ao clone C8 apresentaram 87,2% de similaridade, e resistência intermediária aos antimicrobianos ciprofloxacina e eritromicina. Os isolados P6-7 e P6-15 do clone C16 apresentaram 83,3% de similaridade, resistência à intermediária a ciprofloxacina e eritromicina, resistência à tetraciclina e foram positivos apenas para a presença do gene *tet(M)*.

Os isolados P6-5 e P6-13 do clone C17 apresentaram 100% de similaridade; não apresentou isolados resistentes aos antimicrobianos testados. Os 21 isolados do clone C3, principal perfil clonal dessa espécie, apresentaram fenótipo de multirresistência, tendo suscetibilidade diminuída aos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacin e eritromicina.

Com base nos perfis obtidos dos 74 isolados de *E. faecalis*, foi possível observar 5 perfis clonais diferentes (C1, C2, C10, C14, C15), sendo que o C14 foi o perfil clonal predominante entre os *E. faecalis*, constituído por 54 isolados oriundos de três amostras diferentes (Figura 12). O segundo perfil clonal mais frequente foi o C15, que apresentou 11 *E. faecalis*, seguido do clone C2, com cinco isolados *E. faecalis*; e dos clones C1 e C10, cada um com 2 *E. faecalis*.

O perfil clonal C14 foi o perfil clonal principal entre os isolados avaliados, compostos por 54 isolados com 82,6% de similaridade entre eles. Além disso, todos os isolados do clone C14 apresentaram os genes de virulência *gelE*, *ace* e *asa* e 44 isolados produziram gelatinase. Em relação à formação de biofilme, os isolados foram fracos e moderados formadores.

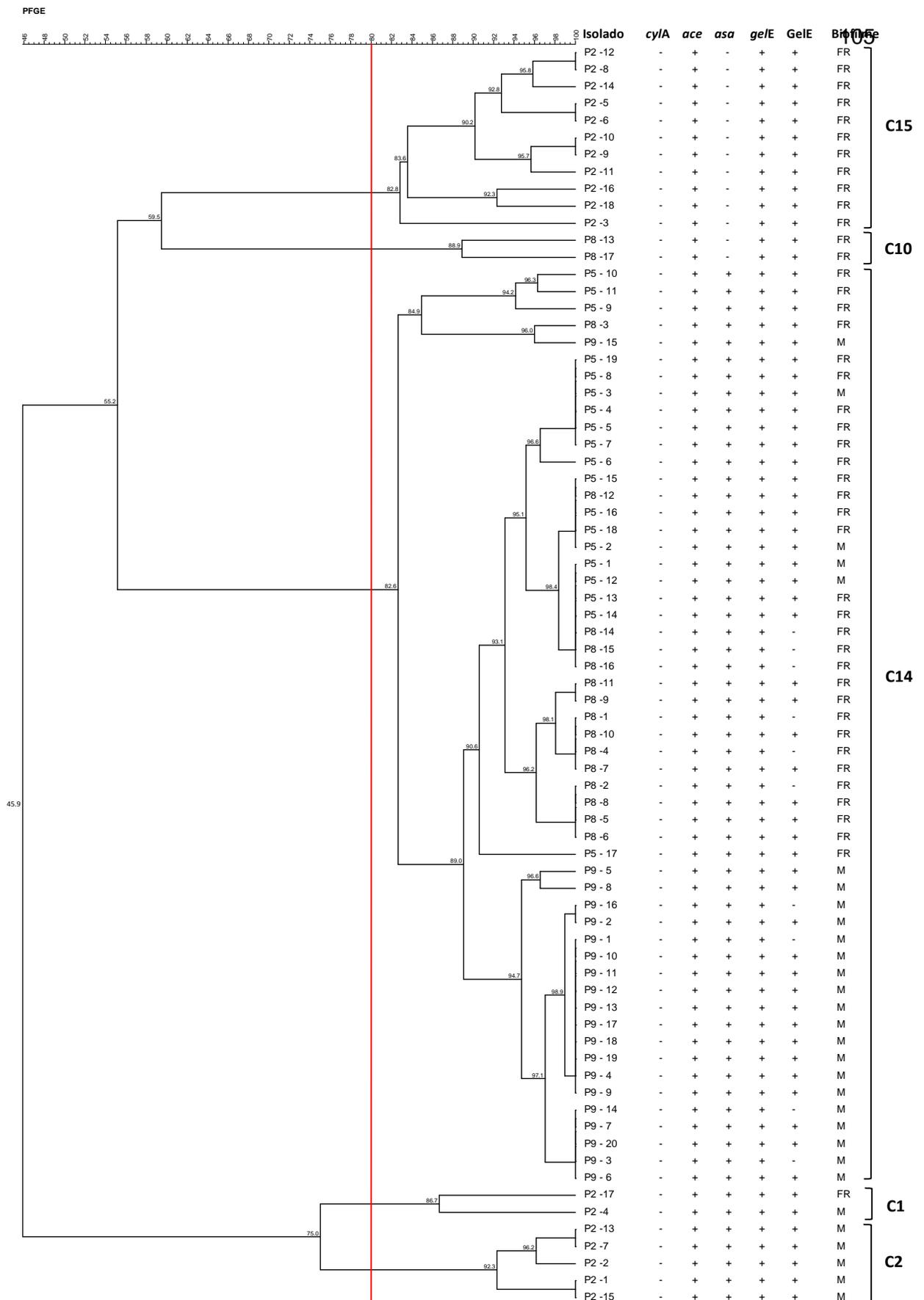


FIGURA 12. Dendrograma gerado a partir dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por PFGE, genes de virulência (*cyiA*, *asa*, *ace*, *gelE*), produção de gelatinase (G) e capacidade de formação de biofilme, dos isolados de *E. faecalis* das amostras P2, P5, P8 e P9. Fonte: A autora.

O clone C15 apresentou 11 isolados de *E. faecalis* com 82,8% de similaridade. Todos os isolados desse perfil apresentaram os genes *gelE* e *ace*, produziram gelatinase, mas foram negativos para a presença dos genes *asa* e *cyfA*. O perfil clonal C2 apresentou cinco isolados de *E. faecalis* com 92,3% de similaridade, que apresentavam os genes de virulência *gelE*, *ace*, *asa*, produziram gelatinase e foram moderados formadores de biofilme.

O perfil clonal C1 foi composto de apenas dois *E. faecalis* com 86,7% similaridade, que apresentavam os genes de virulência *gelE*, *ace*, *asa*, produziram gelatinase e foram fracos e moderados formadores de biofilme. O clone C10 também apresentou 2 *E. faecalis* com 88,9% similaridade; entretanto, os dois isolados apresentaram apenas os genes *gelE* e *ace*, produziram gelatinase e foram fracos formadores de biofilme.

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

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

(fenotípicas e genotípicas) para se inferir resultados mais precisos (Magalhães et al., 2005).

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

A espécie de *E. faecalis* tem se mostrado bem adaptada ao nicho gastrointestinal de animais marinhos, vencendo a competição com outros enterococos. Spence (2014) salienta que a espécie *E. faecalis* é ubíqua a vários ambientes e um clone dessa espécie também foi predominante em amostras de fezes dos animais marinhos avaliadas na Antártica (tais como focas, elefantes, pinguins-de-adelia e outros). Santestevan (2014) também encontrou o predomínio de *E. faecalis* em amostras de fezes de lobos-marinhos e alta similaridade entre isolados de uma mesma amostra.

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

No caso dos pinguins, os filhotes recém-nascidos podem adquirir a sua microbiota a partir da superfície do ovo, circundante no ambiente (ninho) nas colônias, e em sua primeira refeição. O modo de alimentação de filhotes de pinguins por regurgitação também pode aumentar a probabilidade de transmissão vertical bacteriana dos pais para o trato intestinal dos filhotes. Isto pode explicar pelo menos em parte, a prevalência do clone C14 presente em três pinguins juvenis que pode ter sido adquirido ainda nas colônias. Quando adultos, parte de suas comunidades bacterianas pode ser adquirida através da dieta (peixes, crustáceos e moluscos) ou da própria água do mar, que pode funcionar tanto como um meio para transporte quanto para o crescimento de micro-organismos (Potti et al., 2002).

Além disso, o predomínio de algumas cepas pode estar relacionado também com o fato de os fatores de virulência estarem mais associados com algumas espécies, as quais acabam levando vantagens sobre as outras e predominando nas amostras (Fischer & Phillips, 2009). Ainda, nos casos de isolamento através de técnicas cultiváveis, a própria metodologia pode ser um limitante, visto que pode favorecer o crescimento de algumas cepas e/ou suprimir outras que não são capazes de crescer nas condições de laboratório testadas.

O sequenciamento do genoma de diversas cepas de enterococos e a utilização de diferentes técnicas como a amplificação aleatória de fragmentos de DNA (RAPD), tipagem por sequenciamento de múltiplos loci (MLST) e análise do polimorfismo numérico de sequências repetitivas em múltiplos loci (MLVA) têm sido aplicados tanto para identificar as linhagens envolvidas em

epidemias e infecções quanto para avaliar a similaridade entre isolados de diferentes nichos ecológicos (Lebreton et al., 2014).

Técnicas como a RAPD demonstraram boa aplicabilidade em alguns estudos epidemiológicos e de variabilidade genotípica (Nallapareddy et al., 2002; Costa et al., 2009). Entretanto, em outros estudos não foram tão eficientes (Santestevam, 2014).

Apesar de o PFGE ser a técnica padrão ouro para tipagem de enterococos, outras técnicas, como MLST e MLVA, têm sido utilizadas para rastrear clones epidemiológicos em ambientes aquáticos (Ahmad et al., 2014; Sadowy & Luczkiewicz, 2014). As principais vantagens desses sistemas são, como no PFGE, a boa tipabilidade das amostras, a reprodutibilidade e o poder discriminatório, tendo a vantagem, em relação à técnica anterior, de permitir comparações em nível global das amostras caracterizadas em bancos de dados internacionais de acesso *online* (Kem et al. 2011).

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

Ahmad et al. (2014) avaliaram a prevalência de espécies, a diversidade, a resistência antimicrobiana e os determinantes de virulência entre os enterococos obtidos de uma praia na costa leste da Malásia. Verificaram diferenças significativas entre isolados de enterococos obtidos da areia, da água do mar e de amostras de água de um rio que desembocava nessa praia. Os enterococos obtidos da água do rio foram mais resistentes e virulentos. Além disso, verificaram a presença de um clone multirresistente comum a esses ambientes que é comumente relacionado a surtos hospitalares. O estudo conclui que a presença de enterococos resistentes a antibióticos e com determinantes de virulência em águas recreativas poderia ser um risco para a saúde pública.

Uma investigação mais intensiva utilizando o sequenciamento de todo o genoma do micro-organismo pode explicar ainda melhor a origem de genes de resistência a antibióticos e virulência e permitir a atribuição das devidas fontes. Spence (2014) avaliou 59 enterococos (57 *E. faecalis* e 02 *E. faecium*) isolados a partir de amostras de água, sedimentos e amostras fecais de alguns animais (dentre estes pinguins da espécie *Pygoscelis adeliae*) da Antártica. Inicialmente, foi realizada a análise da região 16S rRNA e na sequência do gene *pheS* (utilizada por ser uma região com alta variabilidade). Com base nessas análises verificou-se que as sequências dos genes analisados dos 57 *E. faecalis* apresentaram uma homologia superior a 98%, indicando que todos os isolados dessa espécie poderiam representar uma única estirpe e, possivelmente, ter uma única origem. No entanto, o autor ressalta no estudo que a presença de isolados resistentes e sensíveis sugere

duas ou mais estirpes que apresentam alta similaridade de sequências, mas diferem na estrutura do genoma e de genes.

A fim de avaliar o quanto estes isolados de *E. faecalis* eram similares, posteriormente, Spence (2014) realizou o sequenciado de todo o genoma de quatro destes isolados, dois de áreas contaminadas (02 *E. faecalis* de amostras de água) e dois de áreas não contaminadas (01 *E. faecalis* de amostras de água e 01 *E. faecalis* de fezes de pinguim). Os genomas dos dois isolados a partir de áreas contaminadas (com fenótipos altamente resistentes a vancomicina) foram estruturalmente semelhantes ao do genoma de *E. faecalis* V583 patogênico, enquanto os dois isolados de áreas não contaminadas (suscetíveis à vancomicina) foram semelhantes em estrutura com as cepas *E. faecalis* comensais de humanos. Apesar das diferenças na estrutura do genoma e fenótipos de resistência aos antibióticos, todos os quatro isolados codificavam genes de resistência e virulência. No entanto, os genes de resistência a alto nível de resistência a vancomicina e a ampicilina encontrados nos isolados de áreas contaminadas foram atribuídos à atividade humana e ao lançamento de esgoto da estação de pesquisas da Antártica.

O autor salienta ainda que a presença de isolados multirresistentes e virulentos sugere que estes isolados podem ser patogênicos para animais selvagens da Antártica. À medida que cepas ambientais se assemelham a enterococos isolados clínicos, isso pode indicar que estão se movendo em direção a um nicho de patogenicidade podendo representar um risco maior para a vida de animais selvagens do que estirpes comensais (Spence, 2014).

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

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

Sob essa perspectiva, o sequenciamento de genes constitutivos (MLST) ou do genoma completo poderia esclarecer se as linhagens de enterococos resistentes e virulentas encontradas no trato gastrointestinal de pinguins-de-magalhães podem estar relacionadas a complexos clonais

conhecidos mundialmente por causar surtos hospitalares, constituindo, assim, em potencial risco à saúde dos próprios animais, de humanos e/ou ao ambiente marinho em geral.

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

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível isolar bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* de amostras fecais de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) aplicando metodologias seletivas convencionais para este grupo. Com a associação de técnicas como testes fisiológicos e PCR espécie-específicos, foi possível realizar a identificação dos enterococos. Observou-se que as espécies predominantes nas amostras avaliadas foram *E. faecalis* e *E. faecium*, seguidas de *E. hirae* e *E. mundtii*. Esses dados corroboram a hipótese de que os enterococos também são capazes de colonizar o trato gastrointestinal de aves marinhas, como os pinguins da espécie *Spheniscus magellanicus*.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana demonstraram que os enterococos encontrados no trato gastrointestinal de pinguins-de-magalhães foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados. Contudo, foram encontrados enterococos com fenótipos resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e tetraciclina. Entre as espécies de enterococos, *E. faecium* foi a espécie mais resistente aos antimicrobianos avaliados, apresentando inclusive alguns fenótipos de multirresistência. Todos os isolados resistentes à tetraciclina apresentavam o gene *tet(M)* e apenas dois

isolados não apresentavam o gene *tet(L)*. Já o gene *erm(B)* não foi detectado nos isolados resistentes à eritromicina.

O grande número de isolados sensíveis reforça a ideia de que a ausência de contato direto desses animais com antimicrobianos mantém os níveis de resistência baixos. Contudo, a presença de fenótipos resistentes em alguns animais sugere que possa estar ocorrendo esse contato, mesmo que em dosagens mínimas, via cadeia alimentar ou poluentes aquáticos oriundos de ações antrópicas. Sob outra perspectiva, ao considerar que algumas características dos enterococos são inerentes e anteriores à pressão antrópica, a presença de determinantes de resistência pode ser independente do contato com vias de proliferação e pode ter origem no resistoma ambiental. Esses resultados apontam para a importância de mais estudos com esses animais para o melhor entendimento da evolução dos mecanismos de resistência apresentados pelo gênero enterococos.

Genes codificadores de proteínas que podem desempenhar um papel fundamental na patogenicidade dos enterococos e/ou que lhes possibilitam uma vantagem seletiva sobre outros micro-organismos foram encontrados nos isolados do trato gastrointestinal dos animais avaliados, exclusivamente na espécie *E. faecalis*. Além disso, verificou-se que alguns desses genes de virulência, tais como o gene *geE*, estavam sendo expressos em alguns isolados, acarretando na atividade da gelatinase.

Em relação à capacidade de formação de biofilme, houve diferenças na formação de acordo com as espécies de enterococos avaliadas, mas a maioria dos isolados se mostrou fraco formador de biofilme. Além disso, a

formação de biofilme em *Enterococcus* spp. não pareceu estar relacionada a nenhum dos genes avaliados neste trabalho, o que confirma a complexidade e a natureza multifatorial dessa característica.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico dos enterococos foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE) e demonstrou uma alta similaridade entre os isolados de uma mesma amostra, bem como revelou o predomínio de um clone em três das nove amostras avaliadas. Além disso, foi possível estabelecer relação entre os perfis clonais gerados por PFGE e os fatores de virulência presentes nos isolados de enterococos.

Os resultados obtidos neste estudo atentam para a ampla distribuição de genes de virulência e/ou resistência a antimicrobianos entre espécies de enterococos que compõem o trato gastrointestinal de pinguins-de-magalhães. Isso indica que estes enterococos podem constituir um reservatório de tais características e, sendo o ambiente marinho um meio de disseminação, é importante considerar o potencial desse gênero em ocasionar riscos para à saúde desses animais, bem como para outros organismos que compartilham desse ecossistema. Portanto, este estudo contribui tanto para a compreensão da ecologia dos pinguins-de-magalhães quanto para a elucidação da trajetória de propagação de linhagens bacterianas resistentes e virulentas no ambiente marinho.

## 6 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 37, n. 2, p. 127-137, June 2000.

AHMAD, A.; DADA, A. C.; USUP, G.; HENG, L. Y. Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 82, n. 1-2, p. 26-38, 15 May 2014.

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

ASMAT, A.; DADA, A.C.; GIRES, U. Biofilm Formation, *gel* and *esp* Gene Carriage among Recreational Beach Enterococci. **Global Journal of Health Science**, Toronto, v. 6, n. 5, June 2014.

BADGLEY, B. D.; NAYAK, B. S.; HARWOOD, V. J. The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. **Water Research**, London, v. 44, n. 20, p. 5857-5866, Dec. 2010.

BALDASSIN, P.; SANTOS, R. A.; CUNHA, J. M.; WERNECK, M. R.; GALLO, H. Cephalopods in the diet of magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* found on the coast of Brazil. **Marine Ornithology**, Rondebosch (South Africa), v. 38, n. 1, p. 55-57, 2010.

BAQUERO, J.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n.3, p.260-265, June 2008.

BARROS, J.; IGREJAS, G.; ANDRADE, M.; RADHOUANI, H., LÓPEZ, M., TORRES, C.; POETA, P. Gilthead seabram (*Sparus aurata*) carrying antibiotic

resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 62, n. 6, p. 1245-1248, June 2011.

BATES, J.; JORDENS, Z.; SELKON, J. B.. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. **The Lancet**, [S.I.], v. 342, p. 490-491, Aug. 21, 1993.

BENCKE, G. A.; DIAS, R. A.; BUGONI, L.; AGNE, CE; FONTANA, C .S.; MAURÍCIO, G. N.; MACHADO, D. M.. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 100, n. 4, p. 519-556, 30 dez. 2010.

BENDER, E. A.; FREITAS, A. L. P.; REITER, K. C.; LUTZ, L.; BARTH, A. L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 693-700, 2009.

BENNANI, M.; AMAROUCH, H.; OUBRIM, N.; COHEN, N. Identification and antimicrobial resistance of fecal Enterococci isolated in Coastal Mediterranean environments of Morocco. **European Journal of Scientific Research**, Victoria (Seychelles), v. 70, n. 2, p. 266-275, 2012.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Species**. Disponível em: <<http://www.birdlife.org/datazone/speciessearchresults.php?fam=15>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597-607, July-Aug. 2008.

BRANCO, J. O.; BARBIERI, E.; FRACASSO, H. A. A. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. In: VON MATTER, S; STRAUBE, F.; ACCORDI, I.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO-JR., J. F. (Orgs.). **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 219– 235.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Biodiversidade Aquática. **Zona Costeira e Marinha**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z. R.; HARWOODC, V. J. Enterococci in the Environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington DC, v. 76, n. 4, p. 685-706, Dec. 2012.

CAMARGO, I. L. B. C; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin – susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 273-278, 2008.

CAMPOS, S. D. E.; PEREIRA, A.M.; MAIA, A. L. P. S.; COSTA, C. H. C.; MAGALHÃES, H.; ALMOSNY, N. R. P. Identificação de *Edwardsiella tarda* em processo septicêmico em *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes: Spheniscidae): relato de caso. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 224-228, jul-set. 2013.

CASSENEGO, A. P. V.; d'AZEVEDO, P. A.; RIBEIRO, A. M. L.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S. T.; FRAZZON, A. P. G. 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, v. 42, p. 480-488, 2011.

CASSENEGO, A. P. V.; ELLWANGER, J.; d'AZEVEDO, P. A.; RIBEIRO, A. M. L.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica (RJ), v. 33, n.12, p. 1433-1440, dez. 2013.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford (UK), v. 68, n. 4, p. 731-742, 2 Dec. 2012.

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

CECLIMAR – CENTRO DE ESTUDOS COSTEIROS, LIMNOLÓGICOS E MARINHOS. Instituto de Biociências (UFRGS), Imbé (RS). Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira/pinguim-de-magalhaes>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

CHEN, G.; JEFFREY, P. D.; FUQUA, C.; SHI, Y.; CHEN, L. Structural basis for antiactivation in bacterial quorum sensing. **PNAS**, [S.l.], v. 104, n. 42, p. 16474-16479, 16 Oct. 2007.

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

CHUANG-SMITH, O. N. ; WELLS, C. L.; HENRY-STANLEY, M. J.; DUNNY, G. M. Acceleration of *Enterococcus faecium* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. **PLoS One**, San Francisco (USA), v. 5, n. 12, e15798, 30 Dec. 2010.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement**. M100-S23, Wayne (PA, USA), 2013.

COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**, Oxford (UK), v. 5, n. 10, p. 661-669, 2003.

CORAIOLA, A. M. **Indicadores clínicos, hematológicos, bioquímicos e toxicológicos na pré e pós-reabilitação de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no sul do Brasil**. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, , 2012.

COSTA, A. G.; FRAZZON, A. P. G.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S. T. Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p.74-81, 2009.

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

DANTAS, G. P. M.; ALMEIDA, V. S.; MARACINI, P.; SERRA, S. D.; CHAME, M.; LABARTHE, N.; KOLESNIKOVAS, C.; SICILIANO, S.; MATIAS, C. A. R.; MOURA, J. F.; CAMPOS, S. D. E.; MADER, A.; SERAFINI, P. P. Evidence for northward extension of the winter range of magellanic penguins along the Brazilian Coast. **Marine Ornithology**, Rondebosch (South Africa), v. 41, p. 195-197, 2013.

d'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 11-16, Jan.-Feb. 2006.

d'AZEVEDO, P. A. ; FURTADO, G. H.; MEDEIROS, E. A.; SANTIAGO, K. A.; SILBERT, S.; PIGNATARI, A. C. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 195-198, July-Aug. 2008.

DEBROY, S.; G. A. O., P; GARSIN, D. A.; HARVEY, B. R.; KOS, V.; NES, I. F.; SOLHEIM, M. Transcriptional and post transcriptional control of Enterococcal gene regulation. In: GILMORE, M. S; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N. (ed). **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level

by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 12, p. 5857-5860, 10 Apr. 2004.

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

DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; WIJFELS, R.; HAESEBROUCK, F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, 71, n. 1, p. 46-50, 1991.

DEVRIESE, L. A.; VAN DE KERCKHOVE, A.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames (USA), v. 37, n. 3, p. 257-259, July 1987.

DEWAR, M. **Gastrointestinal microbiota of seabirds**. 2012. 221f. Thesis (Doctorate of Philosophy) – Deakin University, Australia, 2012.

DIAZ, J. I.; CREMONTE, F.; NAVONE, G. T. Helminths of the magellanic penguin, *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes), during the breeding season in Patagonian Coast, Chubut, Argentina. **Comp. Parasitol.**, Lawrence, (USA), v. 77, n. 2, p. 172-177, July 2010.

DI CESARE, A.; LUNA, G. M.; VIGNAROLI, C.; PASQUAROLI, S.; TOTA, S.; PARONCINI, P.; BIAVASCO, F. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic resistant *Enterococci* in marine sediments. **PLoS One**, London, v. 8, n. 4, p.e62838, Apr. 2013.

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

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark (USA), v. 67, n. 4, p. 1628-1635, Apr. 2001.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Genus *Enterococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

FDA – Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual** 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

FERGUSON, D. M.; MOORE, D. F.; GETRICH, M. A.; ZHOWANDAI, M. H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford (UK), v. 99, n. 3, p. 598-608, Sep. 2005.

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

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, Reading (UK), v. 155, n. 6, p. 1749-1757, June 2009.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught magellanic penguins (*spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames (USA), v. 24, n. 4, p. 610-619, Oct. 1988.

FONSECA, V. S. S.; PETRY, M. V.; JOST, A. H. Diet of the magellanic penguin on the Coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Waterbirds**, De Leon Springs (USA), v. 24, n. 2, p. 290-293, 2001.

FRACALANZZA, S. A. P.; Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos. 2007. 158 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

FRACALANZZA, S. A. P.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; SANTOS, P. F.; LEITE, P. C.; TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 853-859, Nov. 2007.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterda, v. 88, n. 2-3, p. 105-122, Dec. 2003.

FRAZZON, A. P. G. ; GAMA, B. A.; HERMES, V.; BIERHALS, C. G.; PEREIRA, R. I.; GUEDES, A. G.; d'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 26, p. 365-370, Feb. 2010.

FEPAM – FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER. **Programa de Gerenciamento Costeiro (GERCO/RS)**. Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/programas/gerco.asp>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

FURUKAWA, T.; SUZUKI, Y. A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Microbes Environ.**, [Tagajo], v. 28, n. 4, p. 444-449, Nov. 2013.

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

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C.. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals: participating in the SENTRY program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador (BA), v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GARCÍA-BORBOROGLU, P. ; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA, R. P. Chronic oil pollution harms magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 52, n. 2, p. 193-198, Feb. 2006.

GARCIA-MIGURA, L.; HENDRIKSEN, R. S.; FRAILE, L.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Ames (USA), v. 170, n. 1-2, p. 1-9, May 2014.

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

GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. **Current Opinion in Microbiology**, London; New York , v. 16, n. 1, p. 10-16, Feb. 2013.

GIRAFFA, G. Enterococci in foods. **FEMS Microbiology**, Amsterda, v. 26, n. 2, p.163-171, June 2002.

GOLIŃSKA, E.; TOMUSIAK, A.; GOSIEWSKI, T.; WIĘCEK, G.; MACHUL, A.; MIKOŁAJCZYK, D.; BULANDA, M.; HECZKO, P. B.; STRUS, M. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 19, n. 23, p. 3562-3572, June 2013.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M. ; MARTINIS, E. C. P. . Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods. In: VILAS, A. M. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz, Espanha: Formatex Research Center, 2010. p. 1119-1125. (vol. 2).

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

HALLGREN, A.; CLAEISSON, C.; SAEEDI, B.; MONSTEIN, H. J.; HANBERGER, H.; NILSSON, L. E. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena (Germany), v. 299, n. 5, p. 323-332, June 2009.

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

HAMER, K. C.; SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. Breeding Biology, Life Histories and Life History – Environment Interactions in Seabirds. In: SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. (Orgs.). **Biology of Marine Birds**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 218-253

HIGASHIDE, T.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, A.; OHKUBO, S.; SAKURAI, M.; SHIRAO, Y.; TAMURA, T.; SUGIYAMA, K. Endophthalmitis Caused by *Enterococcus mundtii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 43, n. 3, p. 1475-1476, Mar. 2005.

HIGUITA, N. I. A.; HUYCKE, M. M. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: GILMORE M. S. ; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N. (editors). **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

IUCN – INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/22697822/0>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

ICMBio – INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/cemave/pesquisa-e-monitoramento/pinguim-de-magalhaes.html>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

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

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

JENSEN, A. E.; CHEVILLE, N. F.; THOEN, C. O.; MACMILLAN, A. P.; MILLER, W. G. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 11, n. 2, p. 52-157, Mar. 1999.

JIMÉNEZ, E.; LADERO, V.; CHICO, I.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; LÓPEZ, M.; MARTÍN, V.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, M.; ÁLVAREZ, M. A.; TORRES, C.; RODRÍGUEZ, J. M. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human Milk. **Bio Med. Central Microbiology**, London, v. 13, n. 288, Dec. 2013.

JOHANSSON, D.; RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 55, p. 28-31, Feb. 2013.

JOHNSTON, L. M.; JAYKUS, L. A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. **Appl. Environ. Microbiol.**, Newark (USA), v. 70, n. 5, p. 3133-3137, May 2004.

JUNG, W. K.; LIM, J. Y.; KWON, N. H.; KIM, J. M.; HONG, S. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 102-107, Jan. 2007.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. **J. Clin. Microbiol**, Washington DC, v.37, n. 11, p.3497-3503, Nov. 1999.

KEM, E.; NUNES, S.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DER HEIDE, H. G. J.; SCOULS, L. M. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. **PLoS One**, London, v. 6, e19668, 2011.

KLIBI, N.; AMOR, I. B.; RAHMOUNI, M.; DZIRI, R.; DOUJA, G.; SAID, L. B.; LOZANO, C.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K. B.; MANSOURI, R.; TORRES, C.

Diversity of species and antibiotic resistance among fecal enterococci from wild birds in Tunisia. Detection of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates. **Eur. J. Wildl. Res.**, Berlin, Dec. 2014.

KNIJFF, E.; DELLAGLIO, F.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; TORRIANI, S. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 35-40, Oct. 2001.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 822-830, 17 Feb. 2004.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, Oyster Bay (USA), v. 3, a010306, p. 2013.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance. In: GILMORE, M. S. ; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N.[editors]. **Enterococci**: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

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

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

LAYTON, B. A.; WALTERS, S. P.; LAM, L. H.; BOEHM, A. B. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford (UK), v. 109, n. 2, p. 539-547, Aug. 2010.

LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W.; MCGUIRE, A. M.; GODFREY, P.; GRIGGS, A.; MAZUMDAR, V.; CORANDER, J.; CHENG, L.; SAIF, S.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; WORTMAN, J.; BIRREN B.; WILLEMS, R. J. L.; EARL, A. M.; GILMORE, M. S. Emergence of Epidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* from Animal and Commensal Strains. **mBio**, Washington, v. 4, n. 4, p. 1-10, Aug. 2013.

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

LI, P.; W. U., D; LIU, K.; SUOLANG, S.; HE, T.; LIU, X.; WU, C.; WANG, Y.; LIN, D. Investigation of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* and Enterococci Isolated from Tibetan Pigs. **PLoS One**, San Francisco (USA), v. 9, n. 4, e95623, 2014.

LIN, Y. T.; HSIEH, K. S.; CHEN, Y. S.; HUANG, I. F.; CHENG, M. F. Infective endocarditis in children without underlying heart disease. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 46, n. 2, p. 1-8, June 2012.

LOPES, M. F. S.; SIMÕES, A. P; TENREIRO, R.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterda, v. 112, n. 3, p. 208-214, Jan. 2006.

LU, J; DOMINGO, JWS; LAMENDELLA, R; EDGE, T; HILL, S. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces **Appl. Environ. Microbiol.**, Newark (USA), v. 74, n. 13, p. 3969-3976, July 2008.

MÄDER, A.; SANDER, M.; CASA JR., G. Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim-de-magalhães, *Spheniscus magellanicus* influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, Belém, v. 18, n. 3, p. 228-233, set. 2010.

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

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

MAGIORAKOS A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILIEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively, drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, Stockholm, v. 18, n. 3, p. 268-281, Mar. 2012.

MAIETTI, L. ; BONVINIA, B.; HUYSB, G.; GIRAFFA, G. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart; New York, v. 30, n. 6, p. 509-517, Sep. 2007.

MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **Appl. Environ. Microbiol.**, Newark (USA), v. 65, n. 10, p. 4425-4430, Oct. 1999.

MANNU, L. ; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterda, v. 88, n. 2-3, p. 291-304, Dec. 2003.

MARACCINI, P. A.; FERGUSON, D. M.; BOEHM, A. B. Diurnal variation in *Enterococcus* species composition in polluted ocean water and a potential Role for the Enterococcal carotenoid in protection against photoinactivation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Newark (USA), v. 78, n. 2, p. 305-310, Jan. 2012.

MARINHO, C.; SILVA, N.; POMBO, S.; SANTOS, T.; MONTEIRO, R.; GONÇALVES, A.; MICAEL, J.; RODRIGUES, P.; COSTA, A. C.; IGREJAS, G.; POETA, P. Echinoderms from Azores islands: an unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 69, n. 1-2, p. 122-127, Apr. 2013.

MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, jul. 2005.

MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A. J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T. D. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**. New York, v. 58, n. 1, p. 59-65, May 2007.

MARTIN, J. D.; MUNDT, J. O. Enterococci in insects. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford (UK), v. 24, n. 4, p. 575-580, 1972.

MARTINES-URTAZA, J.; LIEBANA, E. Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Seftenberg in the marine environment and identification of potential source of contamination. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterda, v. 52, p. 255-263, 2005.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 203-214, abr-jun. 2006.

MEDEIROS, A. W. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) –

Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MEDEIROS, A. W. ; PEREIRA, R. I.; OLIVEIRA, D. V.; MARTINS, P. D.; d'AZEVEDO, P. A.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. F. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 1, Apr. 2014.

MICHELS-SOUZA, M. A; CRUZ, P. B. S.; WALLAUER, J. W.; SILVA, G. S. Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus Magellanicus* Forster, 1781) contaminados por petróleo encontrados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 16, n. 1, p. 29-34, jan-jun. 2010.

MORAES, P. M; PERIN, L. M.; TODOROV, S. D.; SILVA JR., A.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford (UK), v. 113, n. 2, p. 318-328, Dec. 2012.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, Jena (Germany), v. 56, n. 12, p. 1581-1588, Dec. 2007.

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

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

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci in animals in a wild environment. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford (UK), v. 11, n. 2, p. 136-140, 1963.

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

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

MURRAY, BE. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington DC, v. 3, n. 1, p. 46-65, Jan. 1990.

NACHTIGALL, G.; JESUS, A. G.; ZVOBODA, D. A.; SANTESTEVAN, N. A.; MINOTTO, E.; MOURA, T. M.; d'AZEVEDO, P.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A. P.G. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio – Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 235-241, abr-jun. 2013.

NALLAPAREDDY, S. R.; QIN, X.; WEINSTOCK, G. M.; HÖÖK, M.; MURRAY, B. E. *Enterococcus faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well as Collagen Type I. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 68, n. 9, p. 5218-5224, Sep. 2000.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; IKE, Y. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche Control. In: GILMORE M. S.; CLEWELL D. B.; IKE Y.; SHANKAR, N. (editors). **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

NIEMEYER, C.; FAVERO, C. M.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; BHERING, R. C. C.; BRANDÃO, P.; CATÃO-DIAS, J. L. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. **Avian Pathology**, London, v. 42, n. 6, p. 546-551, Oct. 2013.

NOWAKIEWICZ, A.; ZIÓŁKOWSKA, G.; ZIEBA, P.; KOSTRUBA, A. Undomesticated Animals as a Reservoir of Multidrug-Resistant *Enterococcus* in Eastern Poland. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames (USA), v. 50, n. 3, p. 645-650, July 2014.

ORAVCOVA, V; ZUREK, L; OWNSEND, A; CLARK, AB; ELLIS, JC; CIZEK, A; LITERAK, I. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene. **Environmental Microbiology**, Newark (USA) v. 16, n. 4, p. 939-949, Apr. 2014.

OSÓRIO, L. G. ; XAVIER, M. O.; LADEIRA, S. R. L.; SILVA FILHO, R. P.; FARIA, R. O.; VARGAS, G. D.; CABANA, A. L.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Study of bacteria isolated from the foot pad of *Spheniscus magellanicus* with and without bumblefoot. **Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 65, n. 1, p. 47-54, 2013.

OSTROLENK, M.; HUNTER, A. C. The distribution of enteric Streptococci. **J. Bacteriol.**, (S.I.), v. 51, n. 6, p. 735-741, 1946.

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

PINTO, M. B. L. C.; SICILIANO, S.; BENEDITTO, A. P. M. D. Stomach contents of the magellanic penguin *Spheniscus Magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic Coast of Brazil. **Marine Ornithology**, Rondebosch (South Africa), v. 35, p. 77-78, 2007.

PINTO, T. C. A. ; SOUZA, A. R. V.; PINA, S. E. C. M.; COSTA, N. S.; NETO, A. A. B.; NEVES, F. P. G.; MERQUIOR, V. L. C.; DIAS, C. A. G.; PERALTA, J. M.; TEIXEIRA, LM. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant

*Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the *atpC* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 51, n. 10, p. 3242-3249, Oct. 2013.

POETA, P.; COSTA, D.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; RUIZ-LARREA, F.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal Enterococci of wild animals in Portugal. **J. Vet. Med. B.**, Berlin; Cambridge, v. 52, n. 9, p. 396-402, 2005.

POTTI, J.; MORENO, J.; YORIO, P.; BRIONES, V.; GARCÍA-BORBOROGLU, P.; VILLAR, S.; BALLESTEROS, C. Bactéria divert resources from growth for magellanic penguin chicks. **Ecology Letters**, Oxford (UK), v. 5, p. 709-714, 2002.

PRICHULA, J.; ZVOBODA, D. A.; PEREIRA, R. I.; SANTESTEVAN, N. A.; MEDEIROS, A. W.; MOTTA, A. S.; d'AZEVEDO, P. A.; GIORDANI, A. R.; FRAZZON, A. P. G. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil. **R. Bras. Ci. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 104-109, abr-jun. 2013.

PÜTZ, K.; SCHIAVINI, A.; REY, A. R.; LÜTHI, B. H. Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southern most distributional range. **Mar. Biol.**, (S.I.), v. 152, p. 1227-1235, 2007.

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

RADHOUANI, H.; POETA, P.; GONÇALVES, A.; PACHECO, R.; SARGO, R.; IGREJAS, G. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). **Journal of Medical Microbiology**, Jena (Germany), v. 61, p. 837-843, June 2012.

RAMSEY, M.; HARTKE, A.; HUYCKE, M. The physiology and metabolism of Enterococci. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL D. B.; IKE Y; SHANKAR, N. (editors). **Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

REIS, E. C. ; AIRES, R. M.; MOURA, J. F.; MATIAS, C. A. R.; TAVARES, M.; OTT, P. H.; SICILIANO, S.; LÔBO-HAJDU, G. Molecular sexing of unusually large numbers of *Spheniscus magellanicus* (Spheniscidae) washed ashore along the Brazilian coast in 2008. **Genetics and Molecular Research**, (S.I.), Dec. 2011.

RESENDE, M. C. C. **Caracterização fenotípica e molecular de Enterococcus isolados na cidade de Porto Alegre**. 2012. 90 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2012.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; d' AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial resistente profile of *Enterococcus* sp. isolated from food in southern Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 125-128, 2009.

RUOPPOLO, V.; VANSTREELS, R. E. T.; WOEHLE, E. J.; HEREDIA, S. A. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P.; MATUS, R.; POLESCHI, C.; GRIOT, K.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SERAFINI, P. Survival and movements of Magellanic penguins rehabilitated from oil fouling along the coast of South America, 2000 –2010. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 64, n. 7, p. 1309-1317, July 2012.

RUZAUSKAS, M.; VIRGAILIS, M.; SIUGZDINIENE, R.; SUZIEDELIENE, E.; SEPUTIENE, V.; DAUGELAVICCIUS, R.; ZIENIUS, D.; SENGAUT, J.; PAVILONIS, A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from livestock in Lithuania. **Veterinarsky Arhiv**, (S.l.), v. 79, n. 5, p. 439-449, 2009.

RYU, H; HENSON, M; ELK, M; TOLEDO-HERNANDEZ, C; GRIFFITH, J; BLACKWOOD, D; NOBLE, R; GOURMELON, M; GLASSMEYER, S; SANTO DOMINGO, JW. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, Newark (USA), v. 79, n. 1, p. 196-204, Jan. 2013.

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

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

SANDOE, J. A. ; WITHERDEN, I. R.; COVE, J. H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M. H. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. **Journal of Medical Microbiology**, Jena (Germany), v. 52, n. 7, p. 547-550, July 2003.

SANTESTEVAN, NA. **Isolamento e avaliação de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (OTARIIDAE: *Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2014. 161f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

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

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

SHEPARD, BD; GILMORE, MS. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. **Infection and Immunity**, Washington DC, v. 70, n. 8, p. 4344-4352, Aug. 2002b.

SILVA, P. M. **Conteúdo gastrointestinal do pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil: análise dos itens alimentares e resíduos poliméricos.** (Monografia) – Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Imbé, 2013.

SOLER, J. J.; MARTÍN-VIVALDI, M.; PERALTA-SÁNCHEZ, J. M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, M. Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. **The Open Ornithology Journal**, Hilversum (Netherlands), v. 3, p. 93-100, 2010.

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

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

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

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

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D. Nest-site characteristics and reproductive success in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **The Auk**, Washington DC, v. 115, n. 1, p. 34-49, 1998.

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

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

SVEC, P.; SEDLACEK, I. Occurrence of *Enterococcus* spp. in Waters. **Folia Microbiol.**, New York, v. 44, n. 1, p. 3-10, 1999.

SVEC, P. ; VANCANNEYT, M.; DEVRIESE, L. A.; NASER, S. M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B; SWINGS, J. *Enterococcus aquamarinus* sp. nov. isolated from sea water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading (UK), v. 55, n. 5, p. 2183-2187, Sep. 2005.

TEIXEIRA L. M.; CARVALHO, M. G.; SHEWMAKER, P. L.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10th ed.. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2011. p. 350-364.

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

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

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

URUMOVA, V.; LYUTZKANOV, M.; PETROV, V. In vitro study of antimicrobial sensitivity of *Enterococcus* isolates from farm birds. **Trakia Journal of Sciences**, Stara Zagora (Bulgaria), v. 3, n. 5, p. 40-45, Dec. 2005.

VANSTREELS, R. E. T. ; ADORNES, A. C.; RUOPPOLO, V.; CANABARRO, P. L.; SILVA-FILHO, R. P.; CATÃO-DIAS, J. L. Gender determination from morphometrics in migrating magellanic penguins *Spheniscus magellanicus*. **Marine Ornithology**, Rondebosch (South Africa), v. 39, p. 215-220, 2011.

VANSTREELS, R. E. T.; ADORNES, A. C.; CABANA, A. L.; NIEMEYER, C.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; DANTAS, G. P. M; ARAÚJO, J.; CATÃO-DIAS, J. L.; GROCH, K. R.; SILVA, L. A.; REISFELD, L. C.; BRANDÃO, M. L.; XAVIER, M. O.; GONZALEZ-VIERA, O.; SERAFINI, P. P.; BALDASSIN, P.; CANABARRO, P. L.; HURTADO, R. F.; SILVA-FILHO, R. P.; CAMPOS, S. D. E.; RUOPPOLO, V. **Manual de campo para a colheita e armazenamento de informações e amostras biológicas provenientes de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)**. 2. ed.. São Paulo: Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, 2012. 62 p.

WALLER, L. **The African Penguin *Spheniscus demersus*: conservation and management issues**. 2011. 293 p. Thesis (Doctorate of Philosophy) – Department of Zoology of University of Cape Town, South Africa, 2011.

WIJETUNGE, D. S.; DUNN, P.; WALLNER-PENDLETON, E.; LINTNER, V.; LU, H.; KARIYAWASAM, S. Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 24, n. 6, p.1166-1171, Nov. 2012.

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

YORIO, P.; BOERSMA, P. D. The effects of human disturbance on Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* behaviour and breeding success. **Bird Conservation International**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 161-173, Sep. 1992.

YORIO, P. ; BORBOROGLU, P. B.; POTTI, J.; MORENO, J. Breeding biology of magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* at Golfo San Jorge, Patagonia, Argentina. **Marine Ornithology**, Rondebosch (South Africa), v. 29, p. 75-79, 2001.

ZOU, L.; WANG, H.; ZENG, B.; LI, J.; LI, X.; ZHANG, A.; ZHOU, Y.; YANG, X.; XU, C.; XIA, Q. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, Pavia (Italy), v. 34, n. 1, p. 73-80, Jan. 2011.

## 7 APÊNDICES

### APÊNDICE A – Manual de coleta e remessa de amostras

As amostras biológicas dos animais deverão ser coletadas para a realização de pesquisa na área de bacteriologia. A coleta deverá ser feita, sempre que possível, dentro de técnicas assépticas, e todas as amostras deverão ser mantidas sob refrigeração em temperatura mais baixa possível – se forem coletadas a campo, em isopor com gelo e, assim que chegarem às instalações apropriadas, em refrigerador ou freezer, sendo encaminhadas ao laboratório o mais rapidamente possível.

Devem ser coletadas amostras de fezes de animais vivos ou recém-mortos que tenham sido encaminhados para o centro de reabilitação ou encontrados na praia. A coleta pode ser feita com suabe retal/cloacal de animais vivos ou de conteúdo intestinal de animais mortos (preferencialmente até Code 2).

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