

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

**CARACTERIZAÇÃO DE *Enterococcus* sp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE  
FEZES DE MORCEGOS *Tadarida brasiliensis***

LETÍCIA DA FONTOURA XAVIER COSTA

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

Porto Alegre

Março/2018



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

**CARACTERIZAÇÃO DE *Enterococcus* sp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE  
FEZES DE MORCEGOS *Tadarida brasiliensis***

Letícia da Fontoura Xavier Costa  
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Ambiental

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2018

iii

### CIP - Catalogação na Publicação

da Fontoura Xavier Costa, Letícia  
CARACTERIZAÇÃO DE Enterococcus sp. PROVENIENTES  
DE AMOSTRAS DE FEZES DE MORCEGOS Tadarida  
brasiliensis / Letícia da Fontoura Xavier Costa. --  
2018.

99 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

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

1. enterococos. 2. genes. 3. resistência. 4.  
virulência. 5. morcego. I. Guedes Frazzon, Ana  
Paula, orient. II. Título.

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



“As pessoas consideram desafios como problemas, mas, pelo contrário, digo que problema é quando não há desafio. Quem não tem desafio não cresce, não evolui, não ganha, não conquista, não está sube. Aquele que sabe que é necessário passar pelo medo, romper uma barreira e transpor um limite para seguir crescendo, comemora sempre que vê um desafio.”

Caio Carneiro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha **família**, pelo apoio e pelo incentivo a estudar, desde pequena, e pelos momentos de descontração. Pelas vezes que me visitavam e buscavam na UFRGS para darmos uma volta ou simplesmente para me levar para casa. Obrigada também pelos momentos nos quais me ajudaram quando precisei. Ao meu marido **Mateus Scherer**, por me apoiar em cada passo dado e acreditar na minha capacidade profissional, além de muitas vezes ter que relevar meu estresse e me emprestar seu ombro amigo. Agradeço a ele também por ter compreendido todos os momentos nos quais estive ausente por causa dos compromissos relacionados ao mestrado. Obrigada de coração, meu amor! Às minhas **amigas engenheiras** pela injeção de ânimo que depositavam em mim nos momentos em que mais precisei, e principalmente a **Daiane Falcão** por ter encarado tantas broncas do mestrado ao meu lado.

À minha orientadora **Ana Paula Guedes Frazzon**, por ter me recebido de braços abertos e me proporcionado uma das melhores experiências da minha vida, tanto em âmbito profissional quanto pessoal. Agradeço à ela, também, as oportunidades oferecidas e a confiança que depositou em mim e no meu trabalho em bancada.

Agradeço muito às minhas amigas **Tiela Trapp Grassotti** e **Priscila Ribeiro Jankoski** pela amizade e parceria incondicionais e pelas injeções de ânimo que me propuseram em alguns momentos em que precisei. A Priscila foi capaz de acalmar minha alma sempre sabendo o que dizer, me acompanhando infinitas vezes nas idas e voltas para casa. A Tiela sempre me motivando e dando aquele puxão na orelha, mas ao mesmo tempo com o coração mole. Foi ela que encarou uma viagem pela Europa comigo para vivenciar nosso primeiro congresso (e viagem) internacional. Agradeço à elas também por toda ajuda prestada enquanto eu escrevia esta dissertação. Amo vocês amigas! Vocês são parcerias sempre!

Agradeço muito a minha amiga **Priscila Moraes**, que dividiu diversos momentos importantes comigo e sempre foi capaz de me ajudar quando eu mais precisava, sempre encontrando um tempo para mim, inclusive nas suas férias. Também agradeço a **Tiane de Moura**, que foi capaz de no meio de suas férias auxiliar a organizar os dados deste trabalho e realizar uma reunião em um calor de

35°C, me ensinando a analisar os resultados e sendo a companhia de uma boa conversa.

Agradeço aos **colegas** de laboratório, capazes de sanarem dúvidas, auxiliarem nas atividades de rotina e me divertirem em dias em que as coisas estavam complicadas. Ao **Alberto Araújo** por me fazer dar muitas risadas além de sempre ser capaz de explicar assuntos relacionados ao nosso grupo de pesquisa. Ao meu querido amigo **Cristopher Yerena** por ter me passado tantos conhecimentos do México, e até mesmo do Brasil. Ao colega **Cláudio Lauer** que se disponibilizou a me ensinar a qPCR. Também à equipe do **Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos** do Instituto de Ciência e Tecnologia em Alimentos-UFRGS, que tiveram disponibilidade em me receber, e principalmente a **Alessandra Danile de Lira**, que me ajudou infinitas vezes na qPCR.

Agradeço à **Caroline Rossi Canani** pela amizade e ajuda prestada durante esse período, e seu interesse em ajudar quando necessário. Graças a ela nosso pôster foi para Portugal! À **Juciana Cazarolli** pela ajuda emocional e técnica, escutando meus desabafos e me passando infinitos conselhos. Obrigada pelas dicas de escrita, foram muito importantes!

Aos **professores** que me ensinaram muito além da matéria em sala de aula, e que me propiciaram a experiência em estar do outro lado, em ser professora. Além destes, também aos **graduandos** que passaram pelas minhas mãos, indicando a minha evolução profissional e o caminho que devo seguir.

Agradeço a todos os **colegas e funcionários** da pós-graduação pela amizade e colaboração, inclusive à **Patrícia Valente, Eladir Rodrigues e Jéssica Grosman** pelo apoio prestado sempre que precisei. O meu muito obrigada a **Ana Paula Folmer Corrêa**, uma amiga especial que esteve ao meu lado desde o início do mestrado, que colaborou também muito em âmbito profissional.

Finalmente agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, pois sem ela não seria possível a realização desta pesquisa.



# CARACTERIZAÇÃO DE *Enterococcus* sp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE FEZES DE MORCEGOS *Tadarida brasiliensis*<sup>1</sup>

Autor: Letícia da Fontoura Xavier Costa

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

## RESUMO

Apesar da importância ambiental dos morcegos em ambientes urbanos, poucos estudos relatam a presença de enterococos nestes animais. Este estudo teve como objetivos: a) isolar, identificar as espécies e detectar a presença de genes de resistência e fatores de virulência em enterococos isolados de fezes de morcegos *Tadarida brasiliensis*; e b) avaliar a distribuição das espécies de enterococos por qPCR e dos genes de resistência por PCR nas amostras de fezes de morcegos *T. brasiliensis*. Quatro *pools* de fezes de morcegos foram coletados em três municípios do Estado do Rio Grande do Sul e foram analisados por metodologias utilizando técnicas de microbiologia e moleculares. A partir das análises dos enterococos isolados das fezes, foram identificadas 4 espécies, sendo *Enterococcus faecalis* a mais frequente (83,6%), seguida de *E. casseliflavus* (13,7%), *E. gallinarum* (1,35%) e *E. mundtii* (1,35%). As cepas apresentaram perfil de resistência para rifampicina, eritromicina, norfloxacin, ciprofloxacina e tetraciclina. Dentre as 32 cepas resistentes à eritromicina, 28 apresentaram o gene *ermC*. Das 13 cepas resistentes à ciprofloxacina e norfloxacin nenhuma foi positiva para o gene *gyrA*. A única cepa resistente à tetraciclina apresentou o gene *tetM*. Os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub> foram observados em cepas de *E. faecalis*. Quanto à presença dos genes de virulência, maior incidência foi observada para os genes *gelE* (97,3%) e *ace* (91,8%), seguido por *agg* (49,3%), *cylA* (5,5%) e *esp* (2,7%). A análise por qPCR permitiu identificar as espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. hirae* nas fezes dos morcegos. Os genes de resistência *ermC*, *gyrA*, *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub> foram detectados por PCR. Em conclusão, diferentes espécies de enterococos fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de morcegos *T. brasiliensis* e a presença de elementos de resistência e virulência podem estar relacionadas a fatores antropogênicos ou ter origem no resistoma ambiental.

<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. (99 p.) Março, 2018.

# CHARACTERIZATION OF *Enterococcus* sp. OF FECES SAMPLES FROM *Tadarida brasiliensis* BATS<sup>1</sup>

Author: Letícia da Fontoura Xavier Costa

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

## ABSTRACT

Despite the environmental importance of bats in urban environments, few studies have reported the presence of enterococci in these animals. This study aimed: a) isolate, to identify the species and to detect the presence of resistance genes and virulence factors in enterococci isolated from feces of *Tadarida brasiliensis* bats; b) to evaluate the distribution of the enterococci species by qPCR and the resistance genes by PCR in the faecal samples of *T. brasiliensis* bats. Four pools of bats feces were collected in three places of the Rio Grande do Sul State and analyzed using microbiology and molecular methodologies. From the analysis of enterococci isolated from feces, 4 species were identified, being *Enterococcus faecalis* the most frequent (83.6%), followed by *E. casseliflavus* (13.7%), *E. gallinarum* (1.35%) and *E. mundtii* (1.35%). The strains showed a resistance profile to rifampicin, erythromycin, norfloxacin, ciprofloxacin and tetracycline. Of the 32 strains resistant to erythromycin, 28 presented the *ermC* gene. Of the 13 strains resistant to ciprofloxacin and norfloxacin, none were positive for the *gyrA* gene. The single tetracycline resistant strain showed the *tetM* gene. The *vanC*<sub>1</sub> and *vanC*<sub>2-3</sub> genes were observed in *E. faecalis* strains. As regards the presence of virulence genes, higher incidence was observed for to *gelE* (97.3%) and *ace* (91.8%) genes, followed by *agg* (49.3%), *cylA* (5.5%) and *esp* (2.7%). The qPCR analysis allowed to identify the *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* and *E. hirae* species in the bats feces. The *ermC*, *gyrA*, *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> and *vanC*<sub>2-3</sub> resistance genes were detected by PCR. In conclusion, different species of enterococci are part of the gastrointestinal tract microbiota of *T. brasiliensis* bats and the presence of resistance and virulence elements may be related to anthropogenic factors or originate from the environmental resistome.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99 p.) March, 2018.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
2.1 Objetivo Geral.....	2
2.2 Objetivos Específicos.....	2
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
3.1 Morcegos.....	3
3.1.1 <i>Morcegos da espécie Tadarida brasiliensis (l. Geoffroy, 1824)</i> .....	4
3.1.2 <i>A dieta dos morcegos</i> .....	8
3.2 Características do gênero <i>Enterococcus</i> .....	8
3.2.1 <i>Análise molecular de enterococos</i> .....	9
3.3 Análise de diversidade bacteriana a partir do DNA total.....	9
3.4 Suscetibilidade dos enterococos aos antimicrobianos.....	10
3.4.1 <i>Ampicilina</i> .....	11
3.4.2 <i>Cloranfenicol</i> .....	12
3.4.3 <i>Eritromicina</i> .....	12
3.4.4 <i>Estreptomicina e Gentamicina</i> .....	13
3.4.5 <i>Linezolida</i> .....	13
3.4.6 <i>Nitrofurantoína</i> .....	14
3.4.7 <i>Norfloxacina e Ciprofloxacina</i> .....	14
3.4.8 <i>Rifampicina</i> .....	15
3.4.9 <i>Tetraciclina</i> .....	15
3.4.10 <i>Vancomicina</i> .....	16
3.5 Fatores de virulência.....	17
3.5.1 <i>Colágeno de adesão de enterococos</i> .....	18
3.5.2 <i>Substância de agregação</i> .....	18

3.5.3	<i>Citolisina</i> .....	18
3.5.4	<i>Proteína de superfície de enterococos</i> .....	19
3.5.5	<i>Gelatinase</i> .....	19
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1	Coleta das amostras de fezes de morcegos.....	20
4.2	Processamento das amostras: seleção e isolamento de enterococos a partir das amostras de fezes de morcegos.....	25
4.3	Extração do DNA bacteriano das cepas isoladas das amostras de fezes de morcegos.....	27
4.4	Confirmação do gênero e espécies de <i>Enterococcus</i> por PCR.....	27
4.4.1	<i>Confirmação do gênero Enterococcus por PCR</i> .....	27
4.4.2	<i>Identificação das espécies de Enterococcus sp</i> .....	28
4.5	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	29
4.5.1	<i>Concentração inibitória mínima para amostras não suscetíveis à vancomicina</i> .....	30
4.6	Detecção dos genes relacionados à resistência em <i>Enterococcus</i> sp.....	30
4.7	Detecção de genes relacionados aos fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> sp.....	33
4.7.1	<i>Detecção da enzima hemolisina</i> .....	34
4.7.2	<i>Detecção da enzima gelatinase</i> .....	34
4.8	Quantificação das espécies de enterococos nos <i>pools</i> de fezes de morcegos por PCR quantitativa.....	35
4.8.1	<i>Extrações de DNA das fezes de morcegos e das cepas referências de enterococos</i> .....	35
4.8.2	<i>Amplificação convencional da PCR seguida pela PCR quantitativa</i> .....	36
4.8.3	<i>PCR convencional para análise de genes de resistência nas amostras de DNA total</i> .....	37
4.9	Estatística.....	37
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>

5.1	Resultado da distribuição das cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos.....	38
5.2	Perfil de sensibilidade das cepas de enterococos isoladas de amostras de fezes de morcegos e presença de genes de resistência	39
5.3	Frequência dos fatores de virulência entre as cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos.....	42
5.4	Análise da presença de espécies e dos genes de resistência do DNA total das fezes de morcegos.....	45
5.4.1	<i>Análise quantitativa de espécies de enterococos em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.....</i>	45
5.4.2	<i>Deteção de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.....</i>	46
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
6.1	Isolamento e distribuição de espécies de <i>Enterococcus</i> sp. a partir de amostras de fezes de morcegos.....	47
6.2	Suscetibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência presentes em amostras de fezes de morcegos.....	48
6.3	Fatores de virulência detectados nas amostras de fezes de morcegos.....	54
6.4	Análises da distribuição de espécies de <i>Enterococcus</i> em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.....	58
6.5	Deteção de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.....	59
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para identificação de enterococos e de seis espécies deste gênero.....	29
Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a identificação dos genes de resistência.....	32
Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a identificação dos fatores de virulência.....	34
Tabela 4 – Distribuição de cepas isoladas de enterococos separada por espécies.....	38
Tabela 5 – Perfil de resistência e total (%) de amostras com este perfil.....	39
Tabela 6 – Número (%) de cepas isoladas com perfil de resistência divididas por espécies.....	40
Tabela 7 – Detecção de genes de resistência nas cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos.....	41
Tabela 8 – Número de genes de resistência detectados divididos por espécies.....	41
Tabela 9 – Número de cepas positivas para os fatores de virulência nos isolados de amostras de fezes de morcegos.....	42
Tabela 10 – Espécies de enterococos e frequências dos fatores de virulência	43
Tabela 11 – Relação entre genótipo e fenótipo para o fator de virulência da citolisina.....	44
Tabela 12 – Relação entre genótipo e fenótipo para o fator de virulência da gelatinase.....	44
Tabela 13 – Resultados da PCR quantitativa em relação às espécies de enterococos detectadas em DNA total extraído de amostras de fezes de morcegos.....	45
Tabela 14 – Resultado da PCR convencional para identificação de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de <i>Tadarida brasiliensis</i> no mundo.....	5
Figura 2. Morcego <i>Tadarida brasiliensis</i> buscando seu alimento.....	6
Figura 3. Armadilha <i>Harp Trap</i> com morcegos.....	20
Figura 4. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com os locais de coleta de Tavares, Tupanciretã e São Gabriel assinalados em ícones amarelos.....	21
Figura 5. Território do município de Tavares indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.....	22
Figura 6. Território do município de Tupanciretã indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.....	24
Figura 7. Território do município de São Gabriel indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Graus Centígrados
Ace	Proteína de adesão ao colágeno de enterococos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Esp	Proteína de superfície de enterococos
g	Gramas
h	Hora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
km	Quilômetros
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
m	Metros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
TGI	Trato gastrointestinal
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônias



## 1. INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* sp. são bactérias ácido-láticas de grande importância em diversas áreas, como ambiental, clínica e de alimentos. Com ampla disseminação entre os ambientes, este micro-organismo tem a capacidade de sobreviver em locais com características extremas de temperatura, pH e salinidade, por exemplo. Normalmente encontrado no trato gastrointestinal de humanos e animais, os enterococos estão se tornando patógenos emergentes e causadores de infecções hospitalares, apesar de serem bactérias comensais (Murray et al., 1990; Foulquié Moreno et al., 2006; Fisher & Phillips, 2009).

Com ampla disseminação de elementos móveis por conjugação, os enterococos são conhecidos por sua capacidade de transferir genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência por transposons ou plasmídeos. Sendo considerado reservatório de genes de resistência, este gênero vem sendo estudado cada vez mais devido sua capacidade de possuir resistência intrínseca ou adquirida, se tornando uma bactéria potencialmente difícil de ser tratada quando infecta humanos e animais (Jackson et al., 2004; Cawerts et al., 2007; Miller et al., 2014).

A distribuição deste gênero é analisada em diversos animais, sendo os mais frequentes os suínos e os frangos de produção voltados para a alimentação humana. A análise dos enterococos em animais selvagens pode apontar aspectos importantes à respeito das interações e distúrbios ambientais (Poeta et al., 2005; Zou et al., 2011; Jiménez et al., 2013).

Com grande importância no meio ambiente e na área clínica, os morcegos são animais polinizadores capazes de transmitir doenças aos humanos, e apesar de selvagens estes mamíferos são sinantrópicos, o que os torna mais frequentes em contato com humanos e outros animais urbanos. Poucos estudos relacionam a distribuição de espécies de enterococos com a detecção de genes de resistência e fatores de virulência em morcegos (Jardim, 2008).

A justificativa deste estudo é a complementação de estudos que avaliam a diversidade e perfil de enterococos, uma bactéria de importância clínica e ambiental, em animais sinantrópicos de grande importância ambiental, já que se sabe que os morcegos são bioindicadores de condições ambientais. A presença de cepas resistentes isoladas a partir de animais selvagens reforça a influência de

fatores antropogênicos sobre a microbiota normal do animal. Com isso, pretendeu-se avaliar a exposição destes animais aos mais diversos locais e verificar o perfil de resistência desta bactéria sentinela.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição e o perfil de resistência e virulência de *Enterococcus* sp. isolados de amostras de fezes de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar e determinar a diversidade das espécies de enterococos por métodos convencionais e moleculares a partir de amostras de fezes de morcegos insetívoros coletados de diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil;
- 2.2.2 Avaliar o perfil das cepas à suscetibilidade aos antimicrobianos;
- 2.2.3 Detectar a presença de genes de virulência e resistência nas cepas isoladas;
- 2.2.4 Identificar diferentes espécies e dos genes de resistência presentes em *Enterococcus* sp. por métodos moleculares a partir do DNA total purificado das fezes dos morcegos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Morcegos

Os morcegos são os únicos mamíferos capazes de voar e são a segunda maior ordem de mamíferos em relação ao número de espécies. Muitas pessoas consideram os morcegos extremamente perigosos e desagradáveis, porém esses pensamentos estão associados ao pouco conhecimento sobre estes pequenos mamíferos. Os morcegos exercem uma importante função ecológica na dispersão e polinização de plantas, sendo eles os principais responsáveis pela regeneração de florestas degradadas, e também são capazes de realizar o controle de insetos e de pequenos vertebrados. Na medicina humana, a sua saliva tem ação anticoagulante e pode ser empregada no tratamento de doenças vasculares (Jardim, 2008; Eurobats, 2016).

Estes mamíferos são geralmente pequenos e apresentam hábitos crepusculares e noturnos, e parte significativa das espécies orientam-se pela ecolocalização: emissão de sons de alta frequência inaudíveis ao homem que, ao encontrarem um obstáculo, retornam em forma de ecos e são captados pelos seus ouvidos, possibilitando sua orientação (Jardim, 2008).

Das 167 espécies já conhecidas no Brasil, pelo menos 47 espécies podem ser encontradas em áreas urbanas do país, sendo que 40 são encontradas no Rio Grande do Sul. Eles utilizam cavernas, frestas em rochas, folhagens, copas de árvores e palmeiras e edificações (telhados, juntas de dilatação de prédios, porões, sótãos, cumeeiras sem vedação) como abrigos. Os postes de iluminação tem papel fundamental na alimentação dos morcegos, pois nestes locais existe grande concentração de insetos (Jardim, 2008).

Os morcegos são estudados devido a sua aplicação como bioindicadores ambientais, onde estes mamíferos são taxonomicamente estáveis. As populações de morcegos se desenvolvem bem em ecossistemas saudáveis e estáveis, sendo capazes de controlar populações de insetos de forma eficaz, pois sua alimentação muitas vezes se baseia no consumo dessas pragas (Eurobats, 2016; Russo & Jones, 2016).

Apesar dos morcegos terem sido indicados como reservatórios de patógenos humanos, ainda é desconhecida a informação se estes animais carregam

bactérias patogênicas de significância clínica. Recentemente, Veikkolanen et al. (2014) identificaram que os gêneros *Leuconostoc*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, e *Chlamydia* foram os mais frequentemente presentes em fezes de morcegos, sendo que poucos estudos tem analisado a presença de enterococos nas fezes desses animais (Lebreton et al., 2014).

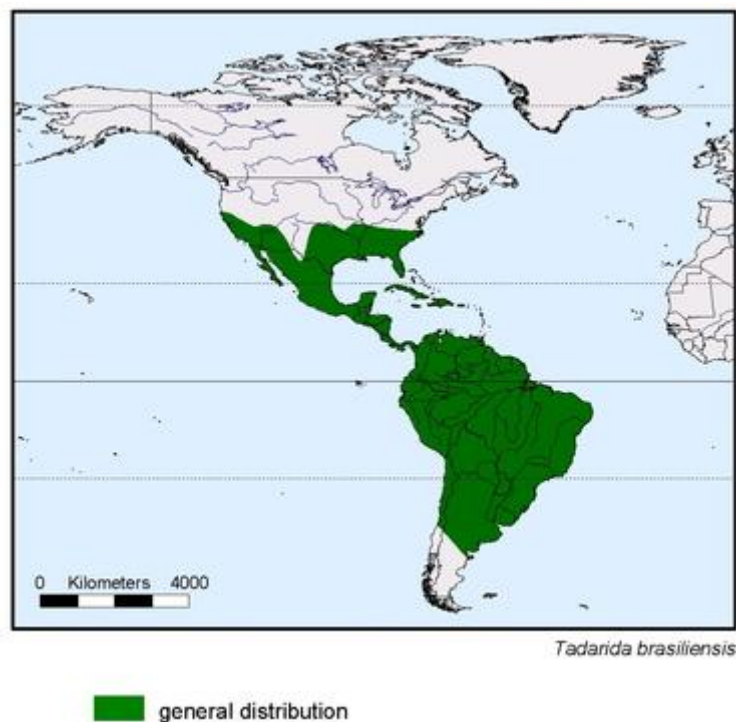
Em estudo realizado por Winter et al. (2017), o Filo Firmicutes é um dos mais abundantes presentes em diferentes espécies de morcegos, sendo que na espécie *Tadarida brasiliensis* chega a 60% de abundância relativa com animais coletados nos Estados Unidos e México, sendo este mesmo Filo a mais prevalente para a espécie. Em um estudo de diversidade microbiana, Yun et al. (2014) também verificaram a presença do Filo Firmicutes na análise de intestino de 218 espécies de insetos, sendo que Proteobactérias e Firmicutes totalizam 82,8% das sequências encontradas na microbiota intestinal destes animais.

### 3.1.1 Morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* (L. Geoffroy, 1824)

O gênero *Tadarida* pertence à Família Molossidae e possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo do sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul, incluindo os países: Brasil, Uruguai, Chile e Argentina, conforme demonstrado na figura 1. Existem oito espécies descritas do gênero *Tadarida*, porém na América do Sul somente a *T. brasiliensis* é encontrada (Fabian & Gregorin 2007; Pesenti et al., 2014).

Portanto, essa espécie de morcegos é a mais frequente nas cidades e a mais abundante no Rio Grande do Sul. Nos meses mais quentes, eles costumam formar colônias que chegam a possuir milhares de indivíduos, localizadas em sótãos ou forros escuros com condições adequadas de umidade e temperatura. Nos últimos anos as populações de *T. brasiliensis* diminuíram, provavelmente devido à redução dos locais que serviam como seu habitat e ao consumo indireto de pesticidas (Wilkins, 1989; Cranford & Fortune, 1994; Gannon et al., 2005; Jardim, 2008).

Figura 1. Distribuição de *Tadarida brasiliensis* no mundo.



Fonte: Groms, 2015.

Cabe ressaltar que os morcegos são espécies silvestres e, no Brasil, estão protegidos pela Lei de Proteção à Fauna e Lei de Crimes Ambientais Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Sua perseguição, caça ou destruição são considerados crimes. Apesar disso, esta espécie está na categoria de baixo risco de extinção segundo IUCN (2012) (Arita, 1993; Gannon, et al., 2005; Jardim, 2008).

Essa espécie de morcegos, também conhecida como *Brazilian free-tailed bats*, é composta por pequenos animais que pesam em torno de 9 a 15 gramas, e suas cores variam de marrom avermelhado a cinza. Estes animais voam a elevadas velocidades, podendo chegar a velocidades próximas a 160 km/h conforme análise realizada por McCracken et al. (2016). Com mais de 3.300 metros, esta espécie possui a altitude de vôo mais alta registrada entre os morcegos. Eles também são capazes de voos de longa distância, permitindo que eles se espalhem por grandes áreas e migrem sazonalmente (Williams et al., 1973; Svoboda & Choate, 1987; Allen et al., 2009).

Os indivíduos da espécie *T. brasiliensis* possuem hábitos sinantrópicos e alimentação insetívora, possuindo preferência por besouros (coleópteros), mosquitos (diptera), percevejos (hemípteros), baratas (blatária) e mariposas (lepidópteros).

Esta via de alimentação faz com que os morcegos entrem em contato com diferentes micro-organismos, os quais podem muitas vezes ser provenientes do solo (Fabian et al., 1990; Annetter et al., 2003; Jardim, 2008; Sato et al., 2015).

Os morcegos desta espécie usam a eco-localização para que seja possível encontrar comida enquanto voam, sendo capazes de percorrer em torno de 100 km ao total de trajetória em uma só noite (McCracken et al., 2008; Barquez et al., 2015; Canku Ota, 2015).

Estes morcegos frequentemente vivem perto de áreas de águas tranquilas que atraem os insetos, podendo ingerir até 50% do seu peso corporal em insetos por noite. As colônias de morcegos desta espécie podem consumir elevada quantidade de insetos a cada noite, variando conforme o número de animais que compõem cada colônia. Dentre outras, essa espécie insetívora é responsável por se alimentar de insetos prejudiciais à agricultura, de modo que estes mamíferos são considerados benéficos para o meio ambiente e para as plantações. Alguns dos insetos que os morcegos consomem são lagartas que atacam culturas como milho, soja e tabaco, entre outras pragas agrícolas. Na figura 2 é possível observar o voo do morcego enquanto busca seu alimento (Jardim, 2008; Canku Ota, 2015).

Figura 2. Morcego *Tadarida brasiliensis* buscando seu alimento.



Fonte: Canku Ota, 2015.

As fezes desses animais podem se acumular, e quando isso ocorre passam a se chamar guano. O guano pode ser utilizado como fertilizante, porém representa risco para a saúde em relação à propagação de doenças, pois é fonte de agentes patogênicos. Durante o verão, o risco de transmissão piora com

temperaturas mais elevadas e maior movimentação dentro das cavernas, o que gera nuvens de poeira. Os morcegos *T. brasiliensis*, como outros mamíferos, são anfitriões do vírus da raiva entre outros, como o vírus da encefalite de St. Louis e a encefalite equina (Jameson, 1959; Davis et al., 1962; Davis & Loomis, 1971; Wilkins, 1989).

A raiva é uma doença nervosa típica dos mamíferos a qual afeta o sistema nervoso central e não possui cura. Entre outros grupos de mamíferos, os morcegos se destacam pela possibilidade de transmissão da doença. Quando estes animais estão infectados apresentam alterações na sua rotina e a infecção leva à morte do animal (Jardim, 2008). Atualmente, 41 espécies de morcegos já foram encontradas com evidências de infecção pelo vírus da raiva no país (Sodré et al., 2010), das quais muitas são sinantrópicas. A proximidade destes animais silvestres com a população humana tem causado preocupação pelo fato de que, além da raiva, os morcegos podem carrear outras doenças de importância em saúde pública (Guia de Manejo e Controle de Morcegos, 2012).

A histoplasmoze também é uma preocupação em potencial para a saúde humana e animal, e é mais frequente em ambientes de cavernas, pois existe grande acúmulo de guano. A doença também tem sido encontrada em edificações urbanas (Gannon, et al., 2005; Jardim, 2008).

### 3.1.2 A dieta dos morcegos

Os insetos são capazes de sobreviverem em diferentes nichos ecológicos, o que os torna o grupo mais bem sucedido entre os animais. O intestino dos insetos podem conter 10 vezes mais micro-organismos que o total de suas células, e estes micro-organismos tem um papel fundamental na digestão e no metabolismo destes animais. Alguns micro-organismos podem ser comensais ou parasitas, enquanto outros são conhecidos por atuar com papel benéfico para seus hospedeiros (Krishnan et al., 2014).

Conforme Lebreton et al. (2014) existe uma grande variedade de insetos, incluindo besouros e moscas, capazes de abrigar a bactéria *Enterococcus* sp., sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies predominantes. Independentemente disso, já foram encontradas também as espécies de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*,

*E. mundtii*, entre outras. Na pesquisa de Shil et al. (2014) foram encontradas bactérias do gênero *Enterococcus* utilizando isolados de três espécies de insetos.

A importância dos insetos para a transmissão de enterococos patogênicos ainda não foi estabelecida. No entanto, moscas e baratas podem servir como vetores ou reservatórios de enterococos resistentes a antibióticos e potencialmente virulentos (Lebreton et al., 2014). Os enterococos podem estar presentes em várias partes do corpo do inseto, porém estão em abundância no trato gastrointestinal destes animais. Os insetos mais comuns contendo esses micro-organismos são mariposas, baratas, moscas e gafanhotos, e é provável que os enterococos sejam agentes causadores de doenças nestes animais (Martin & Mundt, 1972).

### 3.2 Características do gênero *Enterococcus*

Inserido no grupo das bactérias ácido-láticas (*lactic acid bacteria* – LAB) estão os *Enterococcus* sp., encontrados em diferentes ambientes, inclusive no trato gastrointestinal (TGI) de animais vertebrados e invertebrados. Esse gênero compreende micro-organismos com forma de cocos Gram-positivos arranjados em pares ou formando pequenas cadeias. São catalase negativa, apresentam a capacidade de se desenvolverem em concentrações de até 6,5% de cloreto de sódio e em temperaturas que variam entre 10°C e 45°C. São anaeróbios facultativos capazes de hidrolisarem esculina em presença de sais biliares (Manero & Blanch, 1999; Xuerui et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

O gênero *Enterococcus* apresenta uma natureza ubíqua que lhe permite sobreviver em diversos nichos ecológicos. O gênero inclui, atualmente, 54 espécies, sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* descritas como os principais agentes de infecções hospitalares paralelamente com o aumento da resistência aos antimicrobianos, e são também as principais espécies presentes no intestino de humanos e animais. Algumas espécies apresentam colônias pigmentadas, tais como *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pallens* e *Enterococcus sulfureus*. Outras espécies apresentam motilidade, como *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*. Todas as características peculiares de cada espécie têm contribuído para a adaptabilidade e a ampla distribuição do gênero *Enterococcus* na natureza (Lebreton et al., 2014).



Esse gênero de bactérias é considerado um dos maiores patógenos oportunistas, os quais podem causar infecções hospitalares, tais como endocardite, bacteremia e infecções do trato urinário, sistema nervoso central, abdômen e pelvis. (Cauwerts et al., 2007; Choi & Woo, 2015; Pieniz et al., 2015).

Hoje em dia, os enterococos vêm sendo cada vez mais estudados não só por causa das infecções hospitalares que causam, mas sim pelo significativo papel na disseminação e persistência da resistência antimicrobiana. A presença de genes de resistência nas espécies de *Enterococcus* é considerada como alto risco para a saúde humana e animal (Jackson et al., 2004; Cauwerts et al., 2007).

Esse gênero está se disseminando rapidamente no ambiente hospitalar devido a sua capacidade de resposta e flexibilidade genética, tais como o aumento de elementos genéticos móveis, alterações no metabolismo e hipermutabilidade, possuindo um genoma maleável frente a diversas pressões seletivas (Miller et al., 2014).

### 3.2.1 *Análise molecular de enterococos*

A análise molecular do gênero enterococos pode ser realizada empregando a detecção do gene *tuf* que codifica o fator de alongamento EF-Tu envolvido na síntese de proteínas da bactéria, utilizando as Reações em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reactions* – PCR). Essa identificação consegue ser mais discriminativa do que quando utilizado o gene *16S rRNA* para identificação do gênero. A identificação das espécies pode ser feita pela PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, para garantir a correta análise da espécie desejada (Xuerui et al., 2012).

### 3.3 Análise de diversidade bacteriana a partir do DNA total

A distribuição de espécies e as suas proporções em cada nicho podem variar conforme as características individuais, habitat e a localização geográfica correspondente (Lebreton et al., 2014). Alguns testes utilizando o plaqueamento bacteriano em meio de cultivo nutritivo são realizados a fim de analisar a diversidade

dos micro-organismos presentes numa amostra, além de permitir a determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos e descrever os níveis de resistência. No entanto, no plaqueamento utilizando o meio de cultivo será visualizado somente o crescimento das células viáveis que foram submetidas às condições ideais de crescimento, impedindo a análise das bactérias não cultiváveis. Desta forma, a análise da densidade e diversidade populacional fica subestimada. Para tanto, o ideal é utilizar métodos moleculares que empregam a análise a partir do DNA total, para que se possa analisar a diversidade completa de uma determinada amostra (Alexander et al., 2011; Faldynova et al., 2013).

O uso do DNA total como molde da PCR permite amplificação de genes específicos a partir de toda comunidade presente na amostra, e não apenas de células cultiváveis isoladas a partir de meios de cultivo, podendo ser detectados genes presentes em uma microbiota como um todo (Patterson & Singer, 2006).

Entre os métodos moleculares, a técnica de PCR quantitativa (qPCR) vem sendo a técnica adequada para identificação e quantificação de todos micro-organismos presentes em uma amostra (Heid et al., 1996; He and Jiang, 2005, Medeiros et al., 2016).

### 3.4 Suscetibilidade dos enterococos aos antimicrobianos

Conforme Wikler (2007) são indicados para enterococos os grupos de antimicrobianos dos  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina); glicopeptídeos (vancomicina); aminoglicosídeos (estreptomicina e a gentamicina); macrolídeos (eritromicina; oxazolidinonas - linezolida; quinolonas- ciprofloxacina e norfloxacina); cloranfenicol, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina. Cada espécie dispõe de mecanismos de ação diferentes entre si, variando entre os grupos citados acima (Garrido et al., 2014). Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas são usadas no tratamento de animais e humanos, e podem ser uma importante alternativa para o tratamento em humanos contra infecções causadas pelas espécies de enterococos (Aarestrup, 2000a).

Os enterococos são reconhecidos pela resistência intrínseca a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina. A resistência intrínseca ocorre naturalmente e está codificada no cromossomo bacteriano. Este gênero também apresenta resistência adquirida, que ocorre por

meio de mutações no DNA bacteriano ou pela aquisição de genes através da conjugação de elementos móveis extra-cromossômicos, como os plasmídeos conjugativos ou transposons. Essa facilidade na disseminação e aquisição de genes lhes conferem vantagens seletivas para sua sobrevivência e distribuição no ambiente como um todo. Além disso, os elementos móveis não se limitam a gêneros nem a espécies, podendo ser encontrados em ampla faixa de espécies bacterianas (Mundy et al., 2000; Teixeira et al., 2011; Faldynova et al., 2013; Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

Um grande esforço tem sido dedicado à compreensão sobre os mecanismos moleculares de resistência nos enterococos, e os mais importantes são a modificação do alvo, a bomba de efluxo e a inativação enzimática. Estes estudos sobre os mecanismos resultam na identificação de genes específicos que codificam resistência a uma vasta gama de agentes antimicrobianos (Cauwerts et al., 2007; Moura et al., 2013; Garrido et al., 2014; Kristich et al., 2014; Miller et al., 2014).

### 3.4.1 Ampicilina

As espécies do gênero *Enterococcus* normalmente apresentam baixa resistência intrínseca aos  $\beta$ -lactâmicos, como ampicilina e penicilina, onde exercem efeito bacteriostático ao micro-organismo. Por causa disso, uma associação sinérgica bactericida é requerida nos casos de sérias infecções, como endocardite ou meningite. Esse grupo de antibióticos age na parede celular, porém, quando combinado com aminoglicosídeos, atinge alta atividade bactericida. As proteínas de ligação à penicilina são as principais maquinarias de síntese da parede celular e podem ser divididas em dois grupos: classe A, as quais são enzimas bifuncionais que possuem atividade transglicosilase e  $D,D$ -transpeptidase, e classe B, que possuem apenas o domínio transpeptidase e dependem da atividade transglicosilase de outras enzimas (Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos implicam em não formação de peptideoglicano da parede celular bacteriana e na inibição da produção de proteínas de ligação a penicilinas de baixa afinidade. Os genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em enterococos podem ser localizados em plasmídeos ou no cromossomo da bactéria, e são eles classe A: *ponA*, *pbpF* e *pbpZ*; e classe B: *pbp5*, *pbpA* e *pbpB* (Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

### 3.4.2 Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico que inibe a síntese de proteínas ao interagir com a subunidade 50S ribossomal, e a modificação do antibiótico a partir da alteração enzimática é um dos mecanismos de resistência. Foram descritos genes que conferem resistência ao cloranfenicol, chamados genes *cat* (*chloramphenicol acetyltransferase*), que possuem atividade tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Esses genes foram classificados em dois grupos principais: tipo A, que geralmente resulta em uma resistência elevada, e tipo B, que confere baixo nível de resistência ao cloranfenicol. Embora esses determinantes sejam geralmente abrigados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, eles também foram relatados como parte do cromossomo de algumas bactérias (Munita & Arias, 2016).

### 3.4.3 Eritromicina

Na classe de antibióticos dos macrolídeos, quatro mecanismos diferentes podem explicar a resistência adquirida pelas bactérias: a modificação do alvo a partir de mutações precisas, a modificação do alvo pela metilação da subunidade do 23S rRNA, a hidrólise do anel de lactona da molécula do antibiótico e bombas de efluxo. Os genes *ermA*, *ermB* e *ermC* conferem resistência à eritromicina a partir da modificação do alvo por meio da codificação de uma metiltransferase que age em resíduos específicos da subunidade 23S rRNA, causando a dimetilação de resíduos de adenina, impedindo a ligação dos macrolídeos (Sutcliffe et al., 1996; Garrido et al., 2014).

Já os genes *msrA* e *msrC* conferem resistência à eritromicina pelo mecanismo de bombas de efluxo, removendo as substâncias indesejadas para fora da célula. Os genes *msr* pertencem à família transportadora ABC, onde *msrA* é um determinante transmitido por plasmídeo, inicialmente descrito em *Staphylococcus epidermidis*, e *msrC* é uma proteína cromossômica descrita em *E. faecalis*, a qual produz resistência de baixo nível aos macrolídeos (Munita & Arias, 2016).

#### 3.4.4 *Estreptomicina e Gentamicina*

Os enterococos demonstram tolerância intrínseca de baixos níveis ao grupo dos aminoglicosídeos, a qual pode ser mediada por dois fatores: má captação do antibiótico, o que requer altas concentrações para promover a entrada no espaço intracelular, e diminuição da ligação ao alvo ribossomal (Miller et al., 2014).

Conforme Boehr et al. (2001), uma das enzimas de resistência aos aminoglicosídeos mais importantes é AAC(6')-APH (2''). O alto nível de resistência de gentamicina em enterococos é reportado como sendo predominantemente mediado pelo gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica um aminoglicosídeo bifuncional que modifica essa enzima. A ação desta enzima nos enterococos elimina a atividade sinérgica da gentamicina quando combinados com um agente ativo da parede celular, como a ampicilina ou a vancomicina (Boehr et al., 2001).

#### 3.4.5 *Linezolida*

O antimicrobiano linezolida é um agente bacteriostático com ampla atividade contra bactérias Gram-positivas. A resistência a este antimicrobiano se deve a mutação no gene *23S rRNA*, sendo o mecanismo de resistência mais comum entre estes antimicrobianos. A seleção das mutações no *rRNA* está associada com terapias de longa duração com a utilização do antimicrobiano. Cepas resistentes a linezolida podem demonstrar co-resistência a outros antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, gentamicina, macrolídeos, nitrofurantoína, rifampicina e vancomicina (Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

O gene responsável pela resistência à linezolida é o gene *crf*, cujo se enquadra como plasmídeo determinante e vem sendo encontrado em isolados clínicos de *E. faecalis*. Além disso, sua sequência tem estabelecido a transferência de genes de resistência bem como alterado a sequência promotora das proteínas regulatórias ou ativado a expressão de determinantes de resistência. Isso explica a capacidade do gene *crf* ser compartilhado entre as espécies e também fazer possível a disseminação generalizada no cenário clínico (Miller et al., 2014).

### 3.4.6 Nitrofurantoína

A nitrofurantoína é um antibiótico que vem sendo usado há mais de 50 anos, e quando comparado a outras classes de agentes antimicrobianos, a aquisição de resistência a nitrofurantoínas é bastante incomum. Isso se deve ao seu complexo mecanismo de ação, onde o antimicrobiano usa as flavoproteínas de células bacterianas para convertê-las em múltiplas formas intermediárias que danificam o DNA. Esse mecanismo faz com que ocorra a inibição do metabolismo de carboidratos e a interferência na síntese da parede celular. Mesmo assim, os dados são limitados quando se referem à atividade deste antimicrobiano (Meena et al., 2017).

### 3.4.7 Norfloxacin e Ciprofloxacina

O uso do grupo das quinolonas em aplicações clínicas causou um aumento de uma moderada resistência para enterococos, e os alvos destes antimicrobianos são duas enzimas necessárias para a transcrição e replicação celular: DNA girase e topoisomerase IV. Ambas as enzimas são tetrâmeros formados por duas subunidades: GyrA e GyrB, para o complexo DNA girase; e ParC e ParE, para topoisomerase IV. A DNA girase realiza o desenrolamento das fitas de DNA durante o avanço da polimerase, enquanto a topoisomerase IV separa as novas fitas duplas de DNA interligadas e recém replicadas, permitindo que a segregação ocorra antes da divisão celular (Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014)

As quinolonas são capazes de estabilizar esse complexo de clivagem e bloquear a religação das fitas, hidrolisando a ligação entre enzima e DNA, resultando na quebra letal da dupla fita. Quando uma mutação cromossomal do gene alvo ocorre, acontece a substituição de um aminoácido na girase e/ou na topoisomerase IV, sendo este o mecanismo de resistência mais significativo (Hegde et al., 2011; Leavis et al., 2006; Lebreton et al., 2014).

Os genes alvo mais frequentes são *gyrA* e *parC*, e as mutações desses genes são encontradas principalmente em *E. faecalis* e *E. faecium*. Essas alterações afetam a região de ligação com as quinolonas e modificam a afinidade com o antibiótico (Miller et al., 2014).

### 3.4.8 Rifampicina

A rifampicina é um antimicrobiano capaz de inibir a transcrição de mRNA pela ligação à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA de enterococos. Embora a rifampicina não seja amplamente utilizada em infecções enterococais, essas bactérias normalmente são resistentes a esses antibióticos. A resistência surge a partir de uma variedade de mutações no gene *rpoB*, gene este que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, resultantes de tratamentos contra outras infecções bacterianas (Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

### 3.4.9 Tetraciclina

Durante os anos 50 e 60, a tetraciclina foi um dos antibióticos mais utilizados nos Estados Unidos, pois vinha sendo efetivo contra patógenos intracelulares e extracelulares. Este antimicrobiano é muito utilizado por suas características como seu baixo custo, facilidade em ingerir o medicamento (via oral) e por não possuir muitos efeitos colaterais, contemplando amplo espectro de ação contra os micro-organismos (Speer et al., 1992).

Este antimicrobiano possui usos diferentes, como a promoção de crescimento na produção animal. O amplo uso deste antimicrobiano leva à pressão seletiva e conduz a um aumento na presença de genes de resistência adquiridos entre as bactérias de diferentes gêneros (Choi & Woo, 2015).

Os enterococos podem atuar como reservatório de genes de resistência e têm sido observados em isolados ambientais e em cepas clínicas. Quando o antibiótico é adicionado à alimentação animal, mesmo que em baixas concentrações, há um estímulo da transferência de alguns elementos transmissíveis, podendo aumentar essa transferência de elementos que conferem resistência, bem como selecionar as cepas que adquirem esses genes (Speer et al., 1992; Choi & Woo, 2015).

Diferentes mecanismos de ação de resistência adquirida a tetraciclinas têm sido descritas, entre eles a bomba de efluxo do antibiótico da célula bacteriana e a proteção ribossomal (Cauwerts et al., 2007). O primeiro grupo de genes de resistência a tetraciclinas codifica proteínas de bombas de efluxo de tetraciclina

pelos genes *tetL* e *tetK*, onde os plasmídeos codificam proteínas que compõem o domínio da transmembrana e conferem resistência à tetraciclina. Na presença deste antimicrobiano, o complexo ribossomal é incapaz de sintetizar o peptídeo principal. Assim, um segundo sítio de ligação se torna acessível, o que permite a síntese da bomba de efluxo. Desta forma, as proteínas associadas à membrana exportam a tetraciclina da célula reduzindo a concentração do antimicrobiano e protegendo os ribossomos intracelulares (Chopra & Roberts, 2001; Miller et al., 2014; Ness et al., 2014).

O segundo grupo de genes de resistência a tetraciclina inclui os genes *tetM*, *tetO* e *tetS*, que codificam proteínas de proteção ribossomal. Estes genes são determinantes da resistência cromossômica e podem ser transferidos via transposons. Esses genes codificam uma proteína com homologia significativa a fatores de alongação, e como fatores de alongação, essas proteínas são capazes de hidrolisar GTP na presença do ribossomo, o qual altera sua conformação e desloca a tetraciclina ligada. Desta forma, esses genes atuam como protetores ribossomais, e conferem um maior espectro de resistência à tetraciclina do que é observado em bombas de efluxo para este mesmo antibiótico (Chopra & Roberts, 2001; Frazzon et al., 2010; Garrido et al., 2014; Miller et al., 2014).

#### 3.4.10 Vancomicina

Com a facilidade de adaptação dos enterococos em diferentes ambientes, esse gênero tem servido como doador do *cluster* de genes de resistência à vancomicina a diversos micro-organismos patogênicos. Os glicopeptídeos se ligam ao terminal D-Ala-D-Ala impedindo a reticulação das cadeias polipeptídicas e inibindo a síntese da parede celular. A resistência ao antimicrobiano se dá quando ocorre uma mudança no aminoácido terminal do peptideoglicano precursor, onde o terminal D-Ala-D-Ala passa a ser ou D-Ala-D-Lac, conferindo altos níveis de resistência, ou D-Ala-D-Ser, conferindo níveis baixos de resistência (Miller et al., 2014; Ness et al., 2014).

Os *clusters* descritos em *Enterococcus* sp. podem ser diferenciados pelo nível de aminoácidos na enzima ligase, pelo grau de resistência conferida a vancomicina, pela habilidade da indução a teicoplanina e pelo arranjo estrutural do



*cluster* (Miller et al., 2014).

O gene *vanA* produz uma ligase que permite adicionar D-Lac em D-Ala antes de adicioná-la em um precursor de tripeptídeos, e a incorporação desta molécula na parede celular permite a reticulação da estrutura do peptídeoglicano. Além disso, é responsável por altos níveis de resistência a vancomicina e teicoplanina (Bell et al., 1998; Miller et al., 2014; Moura et al., 2015).

O gene *vanB* confere um moderado a alto nível de resistência a vancomicina (Bell et al., 1998). O gene *vanC* é conferido por uma característica intrínseca de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens*, e fenotipicamente apresenta um baixo nível de resistência à vancomicina devido a substituição do D-Ala terminal pelo D-Ser. Porém são suscetíveis à teicoplanina (Bell et al., 1998; Miller et al., 2014).

O fenótipo do gene *vanC* é expresso constitutivamente ou induzivelmente como resultado da produção de precursores de peptídeoglicanos que terminam em D-Ser. Três genes *vanC* que codificam ligases D-Ala:D-Ser tem sido descritos: *vanC*<sub>1</sub> em *E. gallinarum*, *vanC*<sub>2</sub> em *E. casseliflavus* e *vanC*<sub>3</sub> em *E. flavescens* (Courvalin, 2006).

A presença de fatores de virulência não está diretamente ligada à resistência, porém influencia na habilidade da bactéria se manter em ambiente hostil e resistir a defesas do hospedeiro (Miller et al., 2014).

### 3.5 Fatores de virulência

Os fatores de virulência são moléculas que aumentam as capacidades do micro-organismo de aderir, colonizar e causar doenças. Os mais importantes fatores relacionados em enterococos são adesina de colágeno (*ace*), substância de agregação (*agg*), citolisina (*cylA*), proteína de superfície (*esp*) e gelatinase (*geIE*) (Medeiros et al., 2014).

### 3.5.1 Colágeno de adesão de enterococos

O adesina ao colágeno (Ace) é uma proteína de superfície celular codificada pelo gene *ace* que permite a associação de bactérias às proteínas de matriz extracelular, podendo desempenhar um papel na patogênese de endocardites e infecções do trato urinário (Lebreton et al., 2009; Medeiros et al., 2014).

O estudo realizado por Singh et al. (2010) confirma que a deleção do gene *ace* resulta em uma atenuação da capacidade de *E. faecalis* em colonizar válvulas aórticas e causar endocardite, o que representou importante função na aderência bacteriana ao colágeno exposto no local da injúria vascular.

### 3.5.2 Substância de agregação

A substância de agregação é codificada pelo gene *agg*, que proporciona a ligação ao epitélio do hospedeiro e a agregação entre bactérias, facilitando a troca de plasmídeos pela conjugação. Conforme Clewell (1993), a substância de agregação é capaz de mediar uma eficiente transferência de plasmídeo no contato doador-receptor. A proteína da substância de agregação aumenta a hidrofobicidade da superfície enterocócica, a qual pode prevenir ou retardar a fagocitose e a subsequente destinação do organismo (Dunny et al., 1995; Konemann et al., 1997; Süssmuth et al., 2000; Eaton & Gasson, 2001; Shankar et al., 2001; Medeiros et al., 2014).

A presença do gene *agg* em cepas de enterococos pode levar a um aumento da habilidade de colonização, podendo mediar ligações ao epitélio intestinal (Eaton & Gasson, 2001; Koch et al., 2004).

### 3.5.3 Citolisina

Primeiro fator de virulência estudado em enterococos, a citolisina age como uma hemolisina contra alguns eritrócitos e é tóxico para alguns tipos de células eucarióticas. Essa enzima é codificada por um operon contendo oito genes, e pode estar localizado em um plasmídeo ou no cromossomo bacteriano. A citolisina em *E. faecalis* quebra uma ampla gama de células eucarióticas e procarióticas,

apresentando atividade hemolítica e bactericida (Konemann et al., 1997; Qin et al., 2000; Kanemitsu et al., 2001; Mohamed & Huang, 2007; Upadhyaya et al., 2009; Medeiros, 2011).

Os genes presentes no operon da citolisina são *cyR*<sub>1</sub> e *cyR*<sub>2</sub>, que servem como reguladores; *cyL*<sub>L</sub> e *cyL*<sub>S</sub>: codificam as subunidades da citolisina; *cyM*: modifica as subunidades após a tradução; *cyB*: translocação das subunidades através da membrana celular; *cyA*: ativador responsável pela expressão do gene; e *cyI*: autoproteção contra efeitos bactericidas (Vankerckhoven et al., 2004; Medeiros, 2011).

#### 3.5.4 *Proteína de superfície de enterococos*

A proteína de superfície de enterococos (*Esp*), codificada pelo gene cromossomal *esp*, é uma proteína associada à parede celular e está envolvida na evasão imunológica. Esse gene contribui para a colonização e persistência de cepas em infecções, além de participar na formação de biofilme. Esta proteína pode estar associada ocasionalmente a genes *cyI* em uma ilha de patogenicidade (Dunny et al., 1995; Konemann et al., 1997; Shankar et al., 1999; Süßmuth et al., 2000; Eaton & Gasson, 2001; Shankar et al., 2001; Medeiros et al., 2014).

A *Esp* tem sido demonstrada como fator contribuinte na colonização e persistência de alguns isolados de *E. faecalis* durante infecções no trato urinário, e apresenta alta incidência em isolados de origem clínica. Acredita-se que esta proteína tenha importante função na prevalência de isolados potencialmente virulentos, facilitando a adesão tecidual (Medeiros, 2011).

#### 3.5.5 *Gelatinase*

A gelatinase é uma enzima extracelular codificada pelo gene *ge/E*, que tem o poder de hidrolisar caseína, insulina, hemoglobina, fibrinogênio, colágeno e gelatina, entre outros compostos bioativos. Acredita-se que a principal função da gelatinase seja o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido hospedeiro. Sua capacidade hidrolítica pode estar ligada ao

seu papel como fator de virulência, inclusive atuando na modulação da resposta do hospedeiro (Konemann et al., 1997; Qin et al., 2000; Eaton & Gasson, 2001; Kanemitsu et al., 2001; Mohamed & Huang, 2007; Upadhyaya et al., 2009; Medeiros, 2011).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1 Coletas das amostras de fezes de morcegos

As coletas das amostras de fezes de morcegos foram realizadas, em forma de *pool* (n=4), pela equipe especializada para manipular estes animais da Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul.

Antes da coleta dos animais, foi instalada uma lona plástica nova embaixo da colônia destes animais para coleta de fezes e urina frescas. Após o intervalo de 30 minutos – 1 hora, a lona foi retirada e foi instalada uma armadilha do tipo *Harp Trap*, conforme ilustrada na figura 3, na saída das colônias. Quando capturados, os animais foram retirados das armadilhas e inseridos em bolsas de algodão. As fezes encontradas no interior dessas bolsas também foram coletadas.

Figura 3. Armadilha *Harp Trap* com morcegos.



Fonte: Wild Life & Countryside Services, 2017.

Os animais foram, então, anilhados e posteriormente soltos no mesmo local da captura. A sedação não é realizada para esta atividade, pois são animais fáceis de lidar, já que a equipe de coleta era especializada e experiente. As

amostras foram coletadas em três pontos que estão desativados atualmente: Tavares, Tupanciretã e São Gabriel, conforme ilustrado no mapa da figura 4.

Figura 4: Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com os locais de coleta de Tavares, Tupanciretã e São Gabriel assinalados em ícones amarelos.



Fonte: Google Maps, 2018.

1) Amostras M1 e M2: coletadas na construção inacabada do Hospital da cidade de Tavares, com as coordenadas  $31^{\circ}17'16.0''S$   $51^{\circ}05'38.0''W$  (-31.287778, -51.093889), nas datas de 01 de dezembro de 2015 (M1) e 10 de março de 2016 (M2). A colônia de morcegos continha aproximadamente 3.000 indivíduos, sendo que nesse ponto de coleta foram recebidas duas amostras de *pools* de fezes.

O município de Tavares está localizado na Planície Litorânea do Rio Grande do Sul, entre o Oceano Atlântico e a Lagoa dos Patos, e possui 5.351 habitantes conforme o Censo do IBGE (2010b). Seu território compreende 604,26 km<sup>2</sup> de extensão. Com vegetação extensa, esta cidade tem clima subtropical, com temperatura média anual de 17,5°C. Sua altitude é de 15 m em relação ao nível do

mar. Possui um potencial turístico-ecológico notável devido a grande quantidade de aves que se encontram no local. É em Tavares que está situado o Parque Nacional da Lagoa do Peixe. Este parque é considerado um santuário ecológico com fauna e flora invejáveis, sendo este a principal fonte de economia do município, sendo este rota migratória de aves (Prefeitura Municipal de Tavares, 2017). Conforme figura 5, segue uma imagem do território do município. Conforme analisado em Google Maps (2017b), o local da coleta deste município está situado a aproximadamente 12 km da Lagoa dos Patos, 20 km do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, 27 km da Lagoa Capão do F e 50 km da cidade de Mostardas, onde existe o Hospital São Luiz a 35 km e um Posto de Saúde da Família-3 a 40 km.

Figura 5. Território do município de Tavares indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.



Fonte: Google Maps, 2017b.

2) Amostra M3: coletada no antigo Frigorífico da cidade de Tupanciretã, o qual foi desativado na década de 80. Posteriormente, esse mesmo local serviu como local para desossa de suínos, o qual foi desativado por volta do ano de 2015. Atualmente, o prédio do antigo Frigorífico serve para o cultivo de champignons (Costa, 2016). Esse prédio está localizado nas coordenadas 29°04'27.0"S 53°50'21.0"W (-29.074167, -53.839167), e a coleta foi realizada na data de 16 de junho de 2015. Esta colônia de morcegos continha aproximadamente 700 indivíduos.

Com uma área de 2.251,863 km<sup>2</sup>, Tupanciretã possui 22.281 habitantes, conforme o Censo IBGE (2010c). Sua temperatura média anual é de 18°C, com clima mesotérmico úmido, de zona tropical a temperada, e com altitude de 466 m em relação ao nível do mar. O município possui rede hidrográfica composta por rios de médio e pequeno porte, e todos eles são cercados por matas ciliares de pequeno porte, não existindo desmatamento preocupante em suas margens (Cidade-Brasil, 2018; Prefeitura Municipal Tupanciretã, 2017). Conforme Google Maps (2017c), o local da coleta está situado a 10 km do Rio Ivaí e 15 km do Arroio Tipiaia. Além disso, o Hospital de Caridade Brasilina Terra está situado a 1 km do local de coleta deste município. Conforme Figura 6, segue imagem do território do município.

Figura 6. Território do município de Tupanciretã indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.



Fonte: Google Maps, 2017c.

3) Amostra M4: coletada na obra inacabada do Posto de Saúde na cidade de São Gabriel, com as coordenadas  $30^{\circ}20'10.19''S$   $54^{\circ}19'43.86''W$  (-30.336164, -54.328850), na data de 04 de julho de 2016. A colônia de morcegos tinha aproximadamente 10.000 indivíduos.

O município de São Gabriel é composto por 60.425 habitantes conforme Censo IBGE (2010a), e está compreendido dentro de uma área de  $5.020 \text{ km}^2$ . Sua altitude é de 114 m em relação ao nível do mar, e seu clima é quente e temperado, com temperatura média anual de  $19^{\circ}\text{C}$ . Em São Gabriel está situada a Sanga da Bica, com mata nativa preservada e plantas silvestres e exóticas. Além disso, o local de coleta deste município se situa a 2,5 km do Rio Vacacaí e a 5 km do Arroio Piraí (Climate-Data.org, 2018; Google Maps, 2017a; Prefeitura Municipal de São Gabriel, 2017). Conforme Google Maps (2017a), o local de coleta deste município está a 100 m de um Posto de Saúde UBS Brandão Júnior, a 1 km do Hospital Irmandade Santa Casa de Caridade, e a 2 km de outro Posto de Saúde, nomeado como UBS Pam.



Além disso, o município de São Gabriel está situado 45 km de Santa Margarida do Sul, sendo que o local de coleta está situado a aproximadamente 25 km do Posto de Saúde da Santa Margarida do Sul. Conforme Figura 7, segue imagem do território do município.

Figura 7. Território do município de São Gabriel indicado em vermelho e o local da coleta com o ícone em amarelo.



Fonte: Google Maps, 2017a.

As amostras coletadas foram colocadas em criotubos de 2 mL e foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar qualquer tipo de dano ao material e a microbiota ali presente.

#### 4.2 Processamento das amostras: seleção e isolamento de enterococos a partir das amostras de fezes de morcegos

A metodologia foi realizada individualmente para cada amostra. Foi pesada a quantidade de 0,1 g do *pool* das fezes de morcegos e colocada em 1 mL de água peptonada, incubada a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Após esse tempo de

incubação, 1 mL dessa suspensão foi inoculada em 9 mL de meio Caldo Azida Dextrose (*Azida Dextrose Broth*, Himedia®, Índia), e incubada a 35°C durante 24 horas. A partir do crescimento em Caldo Azida (Himedia®), foi realizada diluição seriada em solução salina 0,85% até um exponencial de  $10^{-3}$ , e a técnica de *spread plate* foi utilizada em duplicata 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 35°C, por 48 horas.

A partir de crescimento bacteriano puro, foram selecionadas aleatoriamente aproximadamente vinte colônias de cada amostra, conforme metodologia recomendada pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 1998). Posteriormente, essas culturas foram submetidas aos testes preliminares de caracterização morfo-fisiológica para a identificação quanto ao gênero *Enterococcus*, tais como verificação da capacidade desses isolados de hidrolisar a esculina em presença de sais biliares, produção da catalase e observação das características morfotintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram.

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, Himedia®) e incubadas a 35°C durante 24 horas. Do crescimento em ágar Bile Esculina, as colônias que apresentaram capacidade de hidrolisar esculina na presença de sais biliares (colônias enegrecidas) foram selecionadas e inoculadas em ágar BHI (Himedia®) e incubadas a 35°C durante 24 horas.

A partir do crescimento em ágar BHI (Himedia®) foram realizados os testes de coloração de Gram e da catalase. A identificação presuntiva dos isolados bacterianos foi realizada com a verificação das características morfotintoriais das células bacterianas 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.

A produção da enzima catalase foi verificada a partir de uma suspensão espessa da colônia depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  - Lifar®) a 3% (v/v). A ausência de formação de bolhas, que seriam resultantes da hidrólise da  $H_2O_2$  pela ação da enzima catalase produzida pelo micro-organismo, foi indicativo de reação negativa característica dos enterococos.

Após a caracterização presuntiva quanto ao gênero *Enterococcus*, as bactérias foram inoculadas em ágar BHI (Himedia®) e incubadas a 37°C durante 24 horas e 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.

#### 4.3 Extração do DNA bacteriano das cepas isoladas das amostras de fezes de morcegos

As amostras bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo BHI (Himedia®) e incubadas a 35°C durante 24 horas. A partir deste crescimento foi realizada a extração de DNA por lise química conforme Donato (2007). Os DNAs extraídos foram armazenados a -20°C para realização dos testes moleculares.

#### 4.4 Confirmação do gênero e espécies de *Enterococcus* por PCR

Os estudos moleculares de confirmação do gênero e espécie foram realizados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) no *ThermalCycler* modelo 2720 (*Applied Biosystems by Life Technologies*®) e eletroforese em gel de agarose em concentração 1,5%, com visualização em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

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

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

Para análise do gênero *Enterococcus* sp. foi utilizado o gene *tuf*, com sequência demonstrada na tabela 1. A PCR foi realizada nas condições de 3 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 7 minutos a 72°C. O DNA utilizado como controle positivo foi da bactéria *E. faecalis* ATCC 29212.

#### 4.4.2 Identificação das espécies de *Enterococcus* sp.

A identificação das espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. mundtii* foram realizadas pela PCR com oligonucleotídeos espécies-específicos e condições específicas de amplificação. As sequências estão representadas na tabela 1. As condições de amplificação foram desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto na temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C.

A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. Os controles positivos utilizados para as espécies foram J21 (Santestevan et al., 2015) para *E. casseliflavus*, *E. faecalis* ATCC 29212 para *E. faecalis*, F12 (Medeiros AW, 2011) para *E. faecium*, 11 (Medeiros AW, 2011) para *E. gallinarum*, C1 (Santestevan et al., 2015) para *E. hirae* e J5 (Santestevan et al., 2015) para *E. mundtii* (Medeiros et al., 2016).

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para identificação de enterococos e de seis espécies deste gênero.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Temperatura de anelamento (TA)	Referências
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	55°C	Ke et al. (1999)
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
<i>E. casseliflavus</i> F	TAGGATGTTACGTCTGCGTG	139	58°C	Medeiros et al. (2016)
<i>E. casseliflavus</i> R	TTGTTGGTTTGGGCTTTTCCCG			
E16S 72f	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG	136	66°C	Sedgley et al. (2005)
E16S 210r	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC			
<i>E. faecium</i> F	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	172	62°C	Medeiros et al. (2016)
<i>E. faecium</i> R	CGGAAGTGATGCTTCTACTG			
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	173	52°C	Jackson et al. (2004)
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
HiR1	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA	94	62°C	Prichula et al. (2016)
HiR2	TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC			
MU1	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	98	60°C	Jackson et al. (2004)
MU2	GCCATGATTTTCCAGAAGAATG			

*Enterococcus* sp. – gene *tuf* (Ent1 e Ent2); *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus* F e *E. casseliflavus* R); *E. faecalis* (E16S 72f e E16S 210r); *E. faecium* (*E. faecium* F e *E. faecium* R); *E. gallinarum* (GA1 e GA2); *E. hirae* (HiR1 e HiR2); *E. mundtii* (MU1 e MU2).

#### 4.5 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, 2016). Os ensaios foram realizados com cultivos dos isolados em ágar BHI (Himedia®) obtidos após incubação a 35°C, por 24 horas. A partir desse crescimento, as bactérias foram inoculadas em solução salina 0,85%, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

A partir desta padronização, 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, foram colocados os discos impregnados de antibióticos sobre a superfície dos meios inoculados, com o auxílio de uma pinça bacteriológica previamente esterilizada. Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg),

ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), linezolida (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacin (10 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) da marca Sensidisc (DME®).

Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos, foram utilizados discos de estreptomina (300 µg) e gentamicina (120 µg) da marca Sensidisc (DME®). Após o preparo das placas, foram incubadas a 35 °C durante 18-24 horas. Após esse tempo de incubação, as interpretações dos diâmetros dos halos de inibição foram analisadas conforme as recomendações do CLSI (2016).

#### 4.5.1 Concentração inibitória mínima para amostras não suscetíveis à vancomicina

Os isolados que demonstraram resultados resistente-intermediário ou resistente ao antimicrobiano vancomicina (30 µg) pelo método de disco de difusão foram analisados em relação a concentração mínima inibitória (MIC) conforme recomendações do CLSI (2016). As concentrações testadas foram de 32 µg mL<sup>-1</sup> a 0,5 µg mL<sup>-1</sup>.

As amostras foram pipetadas em duplicata a partir da primeira coluna, sendo as duas últimas reservadas para os controles positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e negativo (caldo e antimicrobiano), respectivamente. A placa foi incubada a 35°C durante 16-20 horas. A leitura da placa foi realizada conforme CLSI (2016), onde a concentração mínima inibitória foi considerada a menor concentração em que não houve crescimento microbiano.

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

A análise dos genes de resistência foi realizada em todas as amostras que apresentaram fenótipo resultante como resistentes-intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos eritromicina (genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrC*), ciprofloxacina e/ou norfloxacin (gene *gyrA*), tetraciclina (genes *tetL*, *tetM*, *tetS*), e vancomicina (genes *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub>). As sequências estão representadas na tabela 2.

A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. Para o gene *gyrA*, a reação da PCR foi realizada como descrito acima com exceção do MgCl<sub>2</sub> que foi empregado na concentração de 3,0 mM.

As reações foram amplificadas nas seguintes condições:

1) Para os genes *ermA*, *ermB* e *ermC*: desnaturação de 3 minutos a 93°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

2) Para os genes *msrC* e *tetM*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

3) Para o gene *gyrA*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

4) Para os genes *tetL* e *tetS*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

5) Para o gene *vanA*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C;

6) Para os genes *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub>: desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os controles positivos utilizados para os genes de resistência foram 485 (Medeiros AW, 2011) para *ermB*; M1.7 para *ermC* (neste estudo); MP12.3 (*E. durans*) para *gyrA*; P6.7 (Prichula J, 2015) para *msrC*; P4.1 (Prichula J, 2015) para *tetL*; P6.7 (Prichula J, 2015) para *tetM*; C12 (Medeiros AW, 2011) para *tetS*; *E. faecalis* ATCC 29212 para *vanA*; *E. faecalis* ATCC 700802 para *vanB*; *E. gallinarum* 11 (Medeiros AW, 2011) para *vanC*<sub>1</sub> e *E. casseliflavus* J21 (Santestevan et al., 2015) para *vanC*<sub>2-3</sub>. (Medeiros et al., 2016; Prichula et al., 2016).

Após a PCR, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração 1,5%, com visualização em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a identificação dos genes de resistência.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Temperatura de anelamento (TA)	Referências
<b>erm(A)_F</b> <b>erm(A)_R</b>	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	420	52°C	Sutcliffe et al. (1996)
<b>erm(B)_F</b> <b>erm(B)_R</b>	GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	547	52°C	Sutcliffe et al. (1996)
<b>erm(C)_F</b> <b>erm(C)_R</b>	TCAAACATAATATAGATAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	837	52°C	Sutcliffe et al. (1996)
<b>gyrA F</b> <b>gyrA R</b>	ATGAACGAATTGGGTGTG AATTTTACTCATACGTGCTT	250	52°C	Rathnayake et al. (2011)
<b>msrC 3</b> <b>msrC 4</b>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG GTAACAAAATCGTTCCCG	343	52°C	Werner et al. (2001)
<b>tet(L)_F</b> <b>tet(L)_R</b>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTAACACG	625	58°C	Frazzon et al. (2010)
<b>tet(M)_F</b> <b>tet(M)_R</b>	GTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	52°C	Aarestrup et al. (2000b)
<b>tet(S)_F</b> <b>tet(S)_R</b>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT ACATAGACAAGCCGTTGACC	720	58°C	Aarestrup et al. (2000b)
<b>van(A)_F</b> <b>van(A)_R</b>	TAATTGAGCAGGCTGTTTCG TACTGCAGCCTGATTTGGTC	80	56°C	Moura et al. (2015)
<b>vanB</b> <b>vanB</b>	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTTGTTCCCTCGACC	635	54°C	Dutka-Malen et al. (1995)
<b>vanC<sub>1</sub></b> <b>vanC<sub>1</sub></b>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCGCCATCATAGCT	822	54°C	Dutka-Malen et al. (1995)
<b>vanC<sub>2-3</sub></b> <b>vanC<sub>2-3</sub></b>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439	54°C	Dutka-Malen et al. (1995)



#### 4.7 Detecção de genes relacionados aos fatores de virulência em *Enterococcus* sp.

A presença dos genes de virulência *ace* (adesina de colágeno), *agg* (substância de agregação), *cyIA* (citolisina), *esp* (proteína de superfície de enterococos) e *geIE* (gelatinase) foram avaliados em todos os isolados bacterianos. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na tabela 3.

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

As reações foram amplificadas em termociclador nas seguintes condições:

1) Para os genes *ace* e *geIE*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

2) Para o gene *agg*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2 minutos a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

3) Para o gene *cyIA*: desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C;

4) Para o gene *esp*: desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os controles positivos utilizados para os fatores de virulência foram C12 (Medeiros AW, 2011) para *ace*; M2.15 (neste estudo) para *agg*; 14 (Medeiros AW, 2011) para *cyIA*; 1260 (Medeiros AW, 2011) para *esp* e C12 (Medeiros AW, 2011) para *geIE*.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose em concentração 1,5%, com visualização em Transiluminador L.Pix (Loccus

Biotechnologia®, Molecular Imaging).

Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a identificação dos fatores de virulência.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Temperatura de anelamento (TA)	Referências
ace1_F ace2_R	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	50°C	Mannu et al. (2003)
agg TE3 agg TE4	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	60°C	Eaton & Gasson (2001)
cylA_TE17 cylA_TE18	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	54°C	Eaton & Gasson (2001)
ESP46 ESP47	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	913	60°C	Shankar et al. (1999)
gelE_F gelE_R	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTCCATC	402	50°C	Eaton & Gasson (2001)

#### 4.7.1 Detecção da enzima hemolisina

Em placa de ágar sangue (Kasvi®), os 73 enterococos isolados foram inoculados por estriamento e incubados a 35°C durante 24 horas. As cepas foram consideradas positivas para a enzima hemolisina quando se verificou a formação de halos ao redor das colônias.

#### 4.7.2 Detecção da enzima gelatinase

Para esse teste, os 73 enterococos isolados foram semeados por estriamento em meio de cultura ágar BHI (Himedia®) e incubados durante 24 horas em estufa a 35°C. A partir desses crescimentos, uma colônia foi inoculada pela técnica de picada em tubos de ensaio individuais, contendo 5 mL de BHI caldo (Himedia®) com gelatina 4% (Labsynth®), a 37°C durante 24 horas. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por até 72 horas, observados a cada 24 horas. Em cada observação, 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, até 72 horas, a 35°C. Por fim, as amostras em que o meio permaneceu sólido foram consideradas negativas para a gelatinase.

#### 4.8 Quantificação das espécies de enterococos nos *pools* de fezes de morcegos por PCR quantitativa

A quantificação das espécies por PCR em tempo real é uma técnica muito sensível, e consegue detectar qualquer quantidade de DNA presente no DNA amostral, sendo necessária uma extração DNA de maior qualidade e pureza. Ela se baseia em duas rodadas: uma pré-amplificação pela técnica de PCR convencional e, posteriormente, a utilização deste pré-amplificado como DNA molde da reação de quantificação.

##### 4.8.1 Extrações de DNA das fezes de morcegos e das cepas referências de enterococos

Os DNAs totais foram extraídos a partir da quantidade de 0,1 g das amostras dos *pools* de fezes de morcegos, conforme protocolo do MO BIO's *Power Fecal DNA Isolation Kit* (Qiagen®). A concentração e a pureza de cada DNA extraído foram determinadas utilizando um espectrômetro de NanoDrop nd-1000 UV (NanoDrop, Wilmington®).

As cepas *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS1274 (D'Azevedo et al. 2006), *E. casseliflavus* J1, *E. gallinarum* F1, *E. hirae* C1 e *E. mundtii* J5 (Santestevan et al. 2015) foram utilizados como cepas de referência. Os DNAs genômicos das cepas de referência foram extraídos usando o kit de purificação *Wizard Genomic Purification* (Promega®) e quantificados em espectrômetro de NanoDrop nd-1000 UV (NanoDrop, Wilmington®). A concentração do DNA bacteriano foi ajustada a 1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  antes de ser utilizado.

#### 4.8.2 Amplificação convencional da PCR seguida pela PCR quantitativa

As reações foram realizadas em duas rodadas de amplificação e seguiram o protocolo estabelecido por Medeiros et al. (2016). A primeira rodada de amplificação (PCR convencional), foi realizada em uma mistura em volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 1 ng de DNA total, 1x de tampão de reação da Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 0.2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen®), 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação.

A PCR convencional foi realizada em termociclador ThermalCycler modelo 2720 (Applied Biosystems by Life Technologies®), nas condições de desnaturação durante 2 minutos a 94°C, seguida por 15 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos na temperatura de anelamento específica do primer utilizado (tabela 1) e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 1 minuto a 72°C;

Para a segunda rodada de amplificação (qPCR), 1  $\mu\text{L}$  de produto de PCR da primeira rodada foi usado como modelo na reação qPCR. As reações da qPCR foram otimizadas em volume total de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 1  $\mu\text{L}$  de produto de PCR da primeira rodada, 1x de tampão de reação da Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 0.1x SYBR Green, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen®), 0.2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 100  $\mu\text{M}$  de dNTPs (Invitrogen®), 0.25 U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. Todas as amostras foram realizadas em quadruplicata.

As amostras foram amplificadas e detectadas usando um sistema de PCR em tempo real Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems StepOnePlus™). As condições de amplificação na qPCR foram divididas em 3 etapas: fase de espera (95°C durante 10 minutos); estágio cíclico (40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e temperatura de anelamento específica de cada oligonucleotídeo durante 1 minuto); e curva de Melting (95°C durante 15 segundos com variação de 0.3°C).

A qPCR foi realizada na condição de *Quantitation – Standard Curve* e foi selecionada a corrida completa. Além disso, a curva padrão foi realizada em quadruplicata, em 6 diferentes pontos sendo utilizada a diluição 1:10 e a concentração inicial foi de 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . As temperaturas e os oligonucleotídeos

utilizados estão na Tabela 1. Os controles positivos utilizados para as espécies foram os mesmo utilizados na PCR convencional.

Para calcular a quantidade de genoma presente na massa foram realizados pela identificação da massa de DNA por genoma. O cálculo da massa do genoma foi feito pela inserção do valor do tamanho do genoma na fórmula abaixo, onde “*m*” é a massa, “*n*” é o tamanho do genoma (pb) e “*e-21*” é  $10^{-21}$  (g pb<sup>-1</sup>). Após encontrar a massa do genoma, foi feita a divisão deste valor pelo número de cópias do gene de interesse pelo genoma haploide.

$$m = (n) \left( 1,096e - 21 \frac{g}{pb} \right)$$

#### 4.8.3 PCR convencional para análise da presença de genes de resistência nas amostras de DNA total

Para verificar a presença dos genes de resistência *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC*, *gyrA*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub> no DNA total extraído a partir de fezes de morcegos, foi utilizada a técnica de PCR convencional. A metodologia desta etapa foi a mesma utilizada no item 4.6 deste trabalho. As amostras eram consideradas negativas somente com o resultado da segunda PCR, que era realizada empregando 1 µl da reação da primeira PCR como DNA molde. Empregando as mesmas condições de ampliações do item 4.6.

#### 4.9 Estatística

Os testes estatísticos foram realizados juntamente com o NAE – Núcleo de Acessoria Estatística da UFRGS, utilizando qui-quadrado para o teste exato de Fischer, pelo programa Spss versão 18.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultado da distribuição das cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos

A partir do isolamento realizado com as amostras de *pools* de fezes de morcegos, foram selecionadas 75 bactérias. Todos os isolados cresceram em meio ágar BHI contendo NaCl 6,5%, hidrolisaram a esculina em meio ágar bile esculina contendo sais biliares, demonstraram catalase negativa e possuíam arranjo morfológico característico do gênero *Enterococcus*. Apesar dos resultados indicarem características típicas do gênero *Enterococcus*, duas delas não foram identificadas pela técnica de PCR. Do total das 75 cepas isoladas, 73 (97,3%) foram confirmadas como o gênero *Enterococcus*, pela técnica de PCR.

Das 73 cepas selecionadas e confirmadas como enterococos, 61 (83,6%) eram *E. faecalis*, 10 (13,7%) *E. casseliflavus*, 1 *E. gallinarum* (1,35%) e 1 *E. mundtii* (1,35%). As espécies *E. faecium* e *E. hirae* não foram encontradas. Estes resultados estão sendo mostrados na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição de cepas isoladas de enterococos separada por espécies.

Amostras	Número de cepas das espécies detectadas pertencentes a <i>Enterococcus</i> sp.				Total (n)
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. mundtii</i>	
M1	0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15
M2	0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15
M3	2 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	21
M4	8 <sup>b</sup>	14 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	22
<b>Total (%)*</b>	<b>10 (13,7)</b>	<b>61 (83,6)</b>	<b>1 (1,35)</b>	<b>1 (1,35)</b>	<b>73 (100)</b>

\*Porcentagem calculada em relação ao número total de *Enterococcus* sp. isolados. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

As amostras M1 e M2 mostraram 100% dos seus isolados como pertencentes à espécie de *E. faecalis*. A amostra M3 apresentou a maior diversidade de espécies de enterococos isoladas, com *E. faecalis* (17/21), *E. casseliflavus* (2/21), *E. gallinarum* (1/21) e *E. mundtii* (1/21). Na amostra M4 foram isoladas somente duas espécies: *E. faecalis* (14/22) e *E. casseliflavus* (8/22).

Com análise estatística foi possível observar que a presença de *E. casseliflavus* foi significativamente maior ( $p=0,003$ ) na amostra M4 do que nas

demais amostras, e a espécie de *E. faecalis* foi significativamente menor ( $p=0,004$ ) na mesma amostra, ambas calculadas pelo teste exato de Fisher.

## 5.2 Perfil de sensibilidade das cepas de enterococos isoladas de amostras de fezes de morcegos e presença de genes de resistência

Os perfis de resistência das amostras analisadas podem ser observados na tabela 5. O perfil com maior frequência de cepas resistentes foi para a rifampicina, com um total de 53 cepas resistentes (72,6%), seguido pela eritromicina com 32 cepas (43,83%), norfloxacin com 7 cepas (9,6%), ciprofloxacina com 6 cepas (8,2%) e tetraciclina com uma cepa resistente (1,37%). Todas as bactérias testadas demonstraram sensibilidade para ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína e vancomicina.

Tabela 5 – Perfil de resistência e total (%) de amostras com este perfil.

Antibióticos		M1	M2	M3	M4	Total (%)*
<b>CIP**</b>	R-I	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	<b>6 (8,2)</b>
	R	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	
<b>ERI**</b>	R-I	9 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	<b>32 (43,8)</b>
	R	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	
<b>NOR**</b>	R-I	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	<b>7 (9,6)</b>
	R	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	
<b>RIF**</b>	R-I	2 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	<b>53 (72,6)</b>
	R	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	19 <sup>c</sup>	14 <sup>a</sup>	
<b>TET**</b>	R-I	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	<b>1 (1,4)</b>
	R	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	

R-I: resistente-intermediário; R: resistente. \*Porcentagem calculada em relação ao número total de *Enterococcus* sp. isolados. \*\*CIP (ciprofloxacina); ERI (eritromicina); TET (tetraciclina); NOR (norfloxacin); RIF (rifampicina). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

Conforme EFSA & ECDC (2013), o perfil de multirresistência de uma bactéria é confirmado quando ela possui baixa suscetibilidade a pelo menos três classes de antimicrobianos. Conforme esta mesma referência, apenas 4 cepas deste trabalho apresentaram perfil de multirresistência. Para os demais isolados, 30 cepas foram resistentes a apenas uma classe de antibiótico, 27 resistentes a duas classes de antibióticos e 12 cepas não demonstraram perfil de resistência a nenhum dos

antibióticos testados.

Em relação aos antimicrobianos analisados, apesar das amostras M1 e M2 serem coletadas do mesmo local, o número de cepas resistentes para alguns antibióticos foram diferentes. O padrão de resistência detectado para a rifampicina demonstrou significância ( $p=0,000$ ) quando comparadas as amostras entre si, observando uma alta suscetibilidade na amostra M1, resistência-intermediária na amostra M2 e alta resistência na amostra M3.

Em relação às espécies e seus perfis de resistência, na tabela 6 se pode observar que *E. faecalis* deteve a maior frequência de cepas resistentes, seguida de *E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum*.

Tabela 6 – Número (%) de cepas isoladas com perfil de resistência apresentados entre as espécies.

Cepas (n)	Número (%) de cepas resistentes aos antimicrobianos				
	CIP*	ERI*	TET*	NOR*	RIF*
<i>E. faecalis</i> (61)	5 (8,19)	29 (47,54)	1 (1,63)	7 (11,47)	43 (70,49)
<i>E. casseliflavus</i> (10)	1 (10)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	8 (80)
<i>E. gallinarum</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0 (0)	1 (100)
<i>E. mundtii</i> (1)	0 (0)	1 (100)	0	0(0)	1 (100)

\*CIP (ciprofloxacina), ERI (eritromicina), TET (tetraciclina), NOR (norfloxacina) RIF (rifampicina).

Dos 32 isolados com perfil de resistência à eritromicina, 28 foram positivos para o gene *ermC*. Os genes *ermA*, *ermB* e *msrC* não foram detectados para nenhuma das cepas resistentes analisadas. Não houve diferença entre os perfis de resistência entre as amostras, o que pode indicar que uma maior urbanização não influenciaria diretamente na resistência à eritromicina.

Entre os 13 isolados com perfil de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina, nenhum deles apresentou resultado positivo quando testados para o gene *gyrA*.

A cepa de *E. faecalis* isolada da amostra M3 que demonstrou resistência ao antimicrobiano tetraciclina, foi positiva para o gene *tetM*. Os genes *tetL* e *tetS* não foram detectados para esta bactéria.

Doze isolados de *E. faecalis* apresentaram perfil fenotípico de resistência-intermediária à vancomicina pelo disco difusão foram submetidos à MIC. Os



resultados da concentração mínima inibitória foram valores equivalentes a  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , considerando todas as cepas sensíveis ao antimicrobiano vancomicina. Estas cepas foram testadas para a presença dos genes *van* pela PCR. Uma cepa foi positiva para os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub> e cinco para o gene *vanC*<sub>2-3</sub>. Nas demais cepas não foram detectados nenhum dos genes associados a este antimicrobiano.

Em relação ao local de coleta, na tabela 7 está a frequência dos genes de resistência detectados. O gene *ermC* apresentou a maior prevalência (38,4%) entre as amostras, seguido por *vanC*<sub>2-3</sub> (9,6%), *tetM* (1,4%) e *vanC*<sub>1</sub> (1,4%), quando calculados em relação ao número total de cepas isoladas neste trabalho.

Tabela 7 – Detecção de genes de resistência nas cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos.

Amostras	Número de cepas positivas para os genes de resistência em relação às amostras			
	<i>ermC</i>	<i>tetM</i>	<i>vanC</i> <sub>1</sub>	<i>vanC</i> <sub>2-3</sub>
M1	8	0	0	0
M2	6	0	0	0
M3	11	1	0	1
M4	3	0	1	5
<b>Total (%)*</b>	<b>28 (87,5)</b>	<b>1 (100)</b>	<b>1 (8,3)</b>	<b>6 (50)</b>

\*Cálculo baseado no número de cepas com perfil de resistência a determinado antibiótico.

Os resultados da quantidade de genes de resistência positivos entre as espécies podem ser observados na tabela 8. A espécie *E. faecalis* conteve o maior número de genes de resistência testados neste trabalho.

Tabela 8 – Número de genes de resistência detectados divididos por espécies.

Genes	Número (%)* de genes de resistência detectados nas espécies	
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>ermC</i>	0	28 (100)
<i>tetM</i>	0	1 (100)
<i>vanC</i> <sub>1</sub>	0	1 (100)
<i>vanC</i> <sub>2-3</sub>	0	6 (85,7)

\*Cálculo baseado no número total de cada gene de resistência detectado.

### 5.3 Frequência dos fatores de virulência entre as cepas isoladas de amostras de fezes de morcegos

O fator de virulência que teve maior frequência entre as cepas foi o gene *ge/E*, abrangendo 97,3% do total das cepas, seguido por *ace* (91,8%), *agg* (49,3%), *cylA* (5,5%) e *esp* (2,7%). Estes resultados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 – Número de cepas positivas para os fatores de virulência nos isolados de amostras de fezes de morcegos.

Amostras	Número de cepas positivas para os genes de fatores de virulência por amostra				
	<i>ace</i>	<i>agg</i>	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>ge/E</i>
<b>M1</b>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
<b>M2</b>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
<b>M3</b>	18 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
<b>M4</b>	19 <sup>a</sup>	4 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
<b>Total (%)*</b>	<b>67 (91,8)</b>	<b>36 (49,3)</b>	<b>4 (5,5)</b>	<b>2 (2,7)</b>	<b>71 (97,3)</b>

\*Porcentagem calculada em relação ao número total de *Enterococcus* sp. isolados. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes.

Para as cepas provenientes das amostras M1 e M2, os fatores de virulência *ace*, *agg* e *ge/E* foram detectados em todos os isolados. Além destes, quatro cepas (27%) isoladas de M2 foram *cylA* positivas.

O fator de virulência *esp* foi positivo apenas para 9,5% das bactérias isoladas em M3. Além deste fator de virulência, nesta amostra também foram encontrados 95,2% de cepas positivas para *ge/E*, 85,7% para *ace* e 9,5% para *agg*. A amostra M4 foi semelhante à amostra M3, onde os fatores de virulência com maior frequência nas bactérias isoladas foram 95,5% positivas para *ge/E*, 86,4% para *ace* e 18,2% para *agg*.

Em relação aos testes fenotípicos para citolisina e gelatinase, todas as cepas positivas para o gene *cylA* foram positivas para o teste fenotípico. Já em relação às bactérias positivas para *ge/E*, dos 71 isolados apenas 37 (52,1%) foram positivos para o teste fenotípico da gelatinase.

A presença da substância de agregação (*agg*) foi significativamente diferente ( $p=0,000$ ) entre as amostras M1/M2 e M3/M4. Nas cepas isoladas das amostras M1 e M2, o gene *agg* teve elevada prevalência entre os isolados, enquanto nas amostras M3 e M4 sua detecção foi baixa. O gene *agg* facilita as ligações dos enterococos às células do intestino, sendo uma forma de adaptação das cepas ao

hospedeiro. O resultado demonstra necessidades desses enterococos isolados se manterem ativos nos morcegos das colônias M1 e M2.

Outro fator de virulência importante encontrado em enterococos é a citolisina. Este fator de virulência age contra uma diversidade de células eucarióticas e procarióticas, e aumenta a capacidade de sobrevivência do micro-organismo em um meio competitivo. O gene *cyIA* teve significância ( $p=0,003$ ) na sua presença na amostra M2. Este fator auxilia na sua sobrevivência, porém em M1 não foi detectado este mesmo gene, representando diferentes características ambientais de um mesmo local de coleta (amostras M1 e M2), ou até mesmo variação entre indivíduos de uma mesma colônia de morcegos.

Os genes *ace*, *esp* e *geE* não tiveram diferença significativa estatística. Os genes *ace* e *geE* estiveram presentes de forma distribuídas entre as 4 amostras, enquanto *esp* foi detectado somente na amostra M3.

A tabela 10 representa os resultados dos fatores de virulência em relação às espécies encontradas. A espécie *E. faecalis* mostrou maior frequência de fatores de virulência, onde *ace* foi positiva em 100% dos isolados, seguido por 98,4% para *geE*, 57,4% para *agg*, 6,5% para *cyIA* e 1,6% para *esp*. Para *E. casseliflavus*, 90% das cepas foram positivas para *geE*, 50% para *ace* e 10% para *esp*. A cepa de *E. mundtii* foi positiva para *ace*, *agg* e *geE*. A cepa de *E. gallinarum* foi positiva somente para o gene *geE*.

Tabela 10 – Espécies de enterococos e frequências dos fatores de virulência.

Genes	Número (%)* de cepas isoladas com fatores de virulência divididas por espécie			
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. mundtii</i>
<i>ace</i>	5 (50)	61 (100)	0	1 (100)
<i>agg</i>	0	35 (57,4)	0	1 (100)
<i>cyIA</i>	0	4 (6,5)	0	0
<i>esp</i>	1 (10)	1 (1,6)	0	0
<i>geE</i>	9 (90)	60 (98,4)	1 (100)	1 (100)

\*Porcentagem calculada em relação ao número total de cepas de cada espécie.

Em relação aos genótipos e fenótipos apresentados pelas cepas isoladas, as tabelas 11 e 12 expõem os resultados dos testes genotípicos e fenotípicos realizados para citolisina e gelatinase em todas as 73 cepas. Todas as quatro cepas positivas para o gene *cyIA* foram positivas para o teste em agar sangue, totalizando

uma frequência de 5,5% entre os isolados de fezes de morcegos. Os demais 69 isolados (94,5%) foram negativos para o gene *cyIA* e para o teste fenotípico (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação entre genótipo e fenótipo para o fator de virulência da citolisina.

Amostras	<i>Relação genótipo/fenótipo das amostras para gene cyIA e teste da citolisina</i>	
	<i>cyIA</i> - / citolisina -	<i>cyIA</i> + / citolisina +
M1	15	0
M2	11	4
M3	21	0
M4	22	0
<b>Total (%)*</b>	<b>69 (94,5)</b>	<b>4 (5,5)</b>

\*Porcentagem calculada em relação ao número total de cepas de enterococos isolados neste trabalho.

A tabela 12 apresenta os dados genotípicos e fenotípicos da gelatinase. Dos 73 isolados testados, 2 (2,7%) foram negativos para o o genótipo e fenotípico, 34 (46,6%) foram positivos para o genótipo e negativos para o fenótipo e 37 (50,7%) foram positivos para o genótipo e fenótipo. Não houve diferença significativa deste resultado entre as amostras.

Tabela 12 – Relação entre genótipo e fenótipo para o fator de virulência da gelatinase.

Amostras	<i>Relação genótipo/fenótipo das amostras para gene gelE e teste da gelatinase</i>		
	<i>gelE</i> - / gelatinase -	<i>gelE</i> + / gelatinase -	<i>gelE</i> + / gelatinase +
M1	0	12	3
M2	0	7	8
M3	1	8	12
M4	1	7	14
<b>Total (%)*</b>	<b>2 (2,7)</b>	<b>34 (46,6)</b>	<b>37 (50,7)</b>

\*Porcentagem calculada em relação ao número total de cepas de enterococos isolados neste trabalho.

A presença de fatores de virulência em bactérias ambientais providenciam vantagens na sobrevivência e proliferação em diferentes ambientes, inclusive fora do ambiente hospedeiro. A conservação de sequências encontradas no trabalho de Soborg et al. (2016) entre alguns dos genes clínicos e ambientais sugere que os

genes ambientais são precursores de genes que conferem virulência em bactérias de relevância clínica.

#### 5.4 Análise da presença de espécies e dos genes de resistência a partir do DNA total isolado das fezes dos morcegos

##### 5.4.1 Análise quantitativa de espécies de enterococos em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos

Com poder de alta sensibilidade, a PCR quantitativa (qPCR) foi capaz de detectar e quantificar espécies do gênero enterococos no DNA total das amostras de fezes de morcegos, incluindo duas (*E. faecium* e *E. hirae*) que não foram encontradas a partir da análise de isolados das fezes. Os resultados da PCR quantitativa estão expressos na tabela 13.

Tabela 13 – Resultados da PCR quantitativa em relação às espécies de enterococos detectadas em DNA total extraído de amostras de fezes de morcegos.

Amostras	Quantidades (n° de cópias/ng) das espécies encontradas pela PCR quantitativa		
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>
M1	1,8 x 10 <sup>2</sup>	7,0 x 10 <sup>3</sup>	5,4
M2	0,071	4,1 x 10 <sup>3</sup>	2,9 x 10 <sup>2</sup>
M3	0,032	2,0 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>
M4	0,0088	0,09	2,8 x 10 <sup>2</sup>

Apesar de apresentarem valores fora dos limites de detecção, foi possível detectar, mas não quantificar, baixas quantidades das espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. mundtii* nas 4 amostras de DNA total. Além disso, *E. casseliflavus*, e *E. gallinarum* e *E. mundtii* foram detectadas nas 4 amostras, sendo anteriormente identificadas apenas nas amostras M3 e M4, e M3, respectivamente. Com base nas técnicas utilizadas e analisando os resultados obtidos foi possível realizar a comparação entre a PCR convencional e a qPCR. A PCR convencional, utilizando cepas isoladas, não demonstra toda a população presente nas amostras, e técnicas mais avançadas e com maior sensibilidade conseguem proporcionar uma melhor perspectiva das espécies presentes não só das bactérias viáveis, mas da

comunidade como um todo, uma vez que a detecção de DNA pode ser realizada com quantidades mínimas nas amostras.

#### 5.4.2 Detecção de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.

Com a utilização da técnica de PCR convencional foi possível detectar os genes de resistência de enterococos nas amostras de DNA total provenientes de fezes de morcegos. Na tabela 14 podemos observar estes resultados. Diferentemente do que encontramos nos isolados bacterianos, os genes *gyrA* e *vanB* foram detectados na amostra M1 e o gene *vanA* na amostra M2, demonstrando a presença destes genes de resistência no DNA total da amostra. Os genes *ermC* e *vanC<sub>2-3</sub>* observados a partir do DNA total das fezes dos morcegos também foram detectados nas cepas isoladas. Os demais genes não foram observados no DNA total das fezes dos morcegos.

Tabela 14 – Resultado da PCR convencional para identificação de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.

Amostras	Genes de resistência detectados no DNA total de cada amostra					
	<i>ermC</i>	<i>gyrA</i>	<i>tefM</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC<sub>2-3</sub></i>
M1	+	+	-	-	+	-
M2	+	-	+	+	-	+
M3	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-	-

+: positivo para o gene; -: ausência do gene ou não detecção pela PCR convencional.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Isolamento e distribuição de espécies de *Enterococcus* sp. a partir de amostras de fezes de morcegos

Os enterococos são comuns no TGI de humanos e animais. A partir do isolamento por meios seletivos específicos para enterococos, 75 bactérias foram selecionadas, sendo que 73 foram positivas para o gênero, com 4 espécies distintas. As porcentagens das espécies encontradas neste trabalho foram 83,6% de *E. faecalis*, 13,7% de *E. casseliflavus*, 1,35% de *E. gallinarum* e 1,35% de *E. mundtii*. A composição bacteriana do *pool* das fezes dos morcegos *Tadarida brasiliensis* pode estar relacionada a duas fontes principais: a idade (dinâmica das espécies) e a dieta dos animais.

Uma vez que as amostras partiram de um *pool* de fezes de colônias de morcegos, e estas colônias contêm animais de diferentes idades. Segundo Jiménez et al. (2013), o leite materno é uma via de transmissão de cepas de enterococos ao trato gastrointestinal de animais juvenis. Neste mesmo estudo foram identificadas as espécies de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* e *E. durans* em amostras de leite materno de diferentes espécies de animais. Esse predomínio de espécies por amostra pode ser influenciado pela idade, caminho migratório percorrido e/ou composição da dieta do animal. A segunda fonte de origem de enterococos baseada na composição da dieta destes animais está relacionada ao fato dos morcegos serem insetívoros, e as espécies de enterococos mais prevalentes em insetos são *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, entre outras (Lebreton et al., 2014). Layton et al. (2010) verificou que a presença de *E. casseliflavus* nas amostras de fezes foi associada à dieta, podendo ser incorporada à microbiota do trato gastrointestinal após o consumo.

As espécies de enterococos encontradas em fezes de *T. brasiliensis* estão de acordo com dados da literatura que salientam a prevalência destas espécies no trato gastrointestinal de humanos e animais (Mundt, 1963; Poeta et al., 2005; Cassenego et al., 2011; Lebreton et al., 2014). O estudo da presença de espécies de enterococos em animais selvagens é escasso. Em 1963 Mundt analisou as fezes de diferentes espécies de morcegos, entre outros animais selvagens, e *E. faecalis* foi identificada nas fezes desses mamíferos.

Santestevan (2014) isolou cepas de diversas espécies de enterococos provenientes de amostras de fezes de lobos-marinhos selvagens. A prevalência de espécies se deu na ordem de *E. faecalis* (50,6%), *E. hirae* (34,4%), *E. casseliflavus* (11,9%), *E. gallinarum* (1,9%), *E. mundtii* (0,6%) e *E. faecium* (0,6%). As espécies de enterococos encontradas no trabalho de Prichula (2015) com suabes retais de pinguins de Magalhães selvagens foram *E. faecalis* (43%), *E. faecium* (33,7%), *E. hirae* (12,8%) e *E. mundtii* (10,5%), porém não foram encontradas espécies de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Em tartarugas marinhas selvagens, Pereira (2016) encontrou 55,7% de *E. faecalis*, 23,4% de *E. faecium*, 15,2% de *E. hirae* e 5,7% de *E. casseliflavus*. Porém em nosso trabalho as espécies de *E. faecium* e *E. hirae* não foram detectadas apesar do uso de metodologias similares.

As espécies acima detectadas também foram encontradas em trabalhos onde os isolados eram provenientes de amostras ambientais (Messi et al., 2006; Byappanahalli et al., 2012; Ali et al., 2013). A espécie *E. faecalis* foi a mais abundante e também a única espécie presente em todas as amostras analisadas neste estudo, sendo um dado concordante com a literatura, onde a prevalência dessa bactéria já é considerada comum no ambiente (Furtula et al., 2013). A espécie *E. casseliflavus* está diretamente relacionada à superfície de plantas (Boehm & Sassoubre, 2014; Byappanahalli et al., 2012), e nesse caso, pode-se deduzir que tanto a movimentação dos morcegos entre árvores e vegetações quanto a sua dieta insetívora podem ter influenciado na elevada quantidade desta espécie detectada na amostra M4. Além de *E. casseliflavus*, a espécie *E. mundtii* é rotineiramente isolada de fontes vegetais conforme estudo de Fisher & Phillips (2009), indicando que os insetos, dos quais os morcegos se alimentam, adquirem sua microbiota a partir da vegetação local e podem transferi-la através da cadeia alimentar.

## 6.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência presentes em amostras de fezes de morcegos

As bactérias resistentes e genes de resistência em animais selvagens permanecem ainda pouco compreendidos, conforme Klibi et al. (2014). Porém, aves migratórias que percorrem longas distâncias podem atuar como transportadoras ou reservatórios de bactérias resistentes, possuindo papel epidemiológico na



disseminação da resistência (Radhouani et al., 2011). O papel destas aves pode ser o mesmo de morcegos em relação ao transporte e disseminação de bactérias resistentes e respectivos genes, pois estes animais percorrem longas distâncias em busca de alimento entrando em contato com grande diversidade de bactérias distribuídas no meio ambiente.

A diferença entre o perfil de resistência das cepas observada neste estudo pode ser explicada pela localidade das coletas. As amostras M1 e M2 coletadas em Tavares não demonstraram uma elevada frequência de cepas de resistência aos antimicrobianos, quando comparado às demais. Isso pode ser devido ao fato deste município não ser muito urbanizado e não possuir Postos de Saúde e Hospitais perto das coordenadas onde foram realizadas as amostragens. Em Tavares existe o parque da Lago do Peixe, rota migratória de diferentes aves, e isso pode ocasionar a diferença na microbiota presente neste município.

Já as amostras M3 e M4 foram coletadas em locais mais urbanizados, o que pode ter refletido no perfil de resistência das bactérias isoladas destas amostras. Nas amostras M3 e M4 foi detectada a presença de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina, e na amostra M3, houve resistência de uma única cepa à tetraciclina. Com proximidades entre 100 m e 1 km de Hospitais e Postos de Saúde, a chance dos morcegos entrarem em contato com maior diversidade de bactérias e disseminarem genes de resistência entre espécies de enterococos em Tupanciretã e São Gabriel é muito maior. Logo, pode-se inferir que a presença da rede de saúde mais próxima e uma maior urbanização sejam fatores determinantes para disseminação de genes de resistência.

Apesar de não utilizarem tratamento terapêutico com antimicrobianos, alguns perfis de resistência foram observados neste trabalho. Um fenótipo variado de resistência é comum entre as cepas de enterococos com origem de animais selvagens (Poeta et al., 2005; Santestevan, 2014; Prichula, 2015; Pereira, 2016). Em todas as amostras avaliadas em nosso trabalho foram verificados perfis de resistência a cinco dos doze antimicrobianos testados, dos quais a rifampicina apresentou a maior porcentagem de cepas com resistência (72,6%). Embora este antibiótico não seja utilizado para tratar infecções enterocócicas, o perfil de resistência à rifampicina observado no presente estudo não é novo, uma vez que as cepas resistentes à rifampicina foram previamente identificadas. Kristich et al., 2014 demonstraram a presença de cepas resistentes em isolados clínicos e Prichula,

2015 e Pereira 2016 de amostras de animais marinhos selvagens.

Em amostras de diferentes origens foram encontradas cepas resistentes à rifampicina (Enne et al., 2004; Valenzuela, 2009; Schwaiger et al., 2011; Martins-Leite et al., 2015), sendo que em outros estudos foram encontradas bactérias do gênero *Enterococcus* em amostras ambientais e de animais (Bessa et al., 2014; Tejedor-Junco et al., 2015) resistentes à rifampicina, mostrando a grande variedade da resistência a este antimicrobiano em relação a origem dos isolados.

A rifampicina é um fármaco presente na maioria das combinações escolhidas para o tratamento da tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Vem se tornando cada vez mais utilizado no tratamento de infecções de estafilococos associadas a dispositivos médicos de habitação, tais como articulações artificiais. As mutações de sítios específicos na codificação genética para a *rpoB* (responsável pela resistência rifampicina) foram identificadas em numerosas e diversas espécies de bactérias, enquanto a inativação enzimática também foi observada em alguns estudos (Kristich et al., 2014). A presença de cepas com baixa susceptibilidade à rifampicina entre enterococos isolados de espécies silvestres reflete a consequência de enterococos comensais sendo expostos a este antimicrobiano. No entanto, outros fatores desconhecidos também podem contribuir para a ocorrência de isolados de enterococos resistentes (Kristich et al., 2014).

Quanto aos antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina, a resistência se dá pela substituição de um aminoácido na girase e/ou na topoisomerase IV, comprometendo a afinidade do antibiótico com a molécula alvo. (Hegde et al., 2011; Leavis et al., 2006; Lebreton et al., 2014). Foi encontrado perfil de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina dentre 10 isolados de amostras de fezes de morcegos, porém o gene *gyrA* (que está relacionado a mutação na girase) não foi detectado dentre as cepas testadas. No estudo de Zou et al. (2011), os isolados de suínos demonstraram alta frequência de resistência a ciprofloxacina, chegando a 64,1% do total de isolados. Estes antibióticos são utilizados para tratamento de infecções no trato urinário em humanos (Lee, 2013; Seo & Lee, 2013; Goel et al., 2016).

Conforme Petersen & Jensen (2004), os resultados das suas análises mostram que cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*, quando expostas às quinolonas, desenvolvem as mesmas mutações pontuais que isolados clínicos, conferindo resistência à estas espécies. Este mesmo estudo mostrou que as espécies de *E.*

*casseliflavus* e *E. gallinarum* são menos suscetíveis à ciprofloxacina que *E. faecalis* e *E. faecium*, porém exibem alterações de aminoácidos nos mesmo códons de ParC e GyrA. Sendo assim, o gene *gyrA* pode não ter sido detectado em nossas amostras pois a presença de outros genes que conferem resistência a essa classe de antimicrobianos podem ter suprido o mecanismo esperado pelo gene *gyrA*.

A interação com insetos, ambiente urbano e rural pode ter feito com que a microbiota dos morcegos tenham adquirido os genes de resistência aos antibióticos, uma vez que os insetos podem atuar como reservatórios de resistência a antimicrobianos. Devido ao uso generalizado dos macrolídeos, os enterococos macrolídeos-resistentes são encontrados normalmente em humanos e animais. Conforme Zou et al. (2011), nos isolados de suínos foi encontrada elevada frequência de cepas resistentes à eritromicina (66,7%). Este alto nível pode estar relacionado ao uso dessa classe de antibióticos nas atividades de pecuária, especialmente para a promoção de crescimento dos animais e tratamento de doenças.

Sabendo que o local de coleta das amostras M3 era um frigorífico e posteriormente local de desossa de suínos, podemos relacionar essa disseminação de genes de resistência ao ambiente onde estão os morcegos, pois é provável que ao sair para coletar alimento estes mamíferos tenham entrado em contato com o interior do ambiente, facilitando a obtenção de bactérias do seu habitat. Dessa forma, infere-se que alguns dos genes de resistência do local de coleta M3 tenham sido adquiridos no próprio habitat desta colônia de morcegos.

Em nossas amostras, as bactérias isoladas a partir de fezes de morcegos, apesar de serem detectados perfis de resistência à eritromicina, no grupo dos genes *erm* somente o gene *ermC* foi encontrado, enquanto *ermA*, *ermB* e *msrC* não foram detectados. Diversos estudos relatam a presença dos genes *ermB* e *msrC* em *E. faecium* de isolados clínicos (Schmitz et al., 2000; Emaneini et al., 2016; Wang et al., 2016), *ermB* ou *msrC* em enterococos isolados de animais selvagens (Santestevan, 2014; Pereira, 2016) e *ermA* em isolados clínicos e de origem animal (Portillo et al., 2000). Poucos estudos relatam a presença do gene *ermC* em enterococos originados em outros tipos de amostras. Jensen et al. (1999) observaram a presença do gene *ermC* em uma cepa de *E. faecium* isolada de porco na Dinamarca. Porém, a presença deste gene tem sido relatada com uma maior frequência em cepas de *Staphylococcus aureus* (Westh et al., 1995; Schmitz et al., 2000; Coutinho et al.,

2010; Lim et al., 2012).

Das cepas isoladas a partir de amostras de fezes de morcegos, apenas uma cepa de *E. faecalis*, proveniente da amostra M3, demonstrou resistência à tetraciclina, sendo positiva para o gene *tetM*. O gene *tetM* é o gene mais frequente em enterococos com resistência à tetraciclina, e está comumente localizado no cromossomo bacteriano, podendo ser carregado por transposons conjugativos, conforme Cauwerts et al. (2007) e Choi & Woo (2015), o que complementa e afirma os dados obtidos neste trabalho.

Além das referências acima, o estudo realizado por Duarte et al. (2005) também afirma que o gene *tet* predominante em isolados resistentes à tetraciclina, provenientes de amostras humanas e bovinas, foi o *tetM*. No município de Tupanciretã existem zonas com vastas vegetações e urbana com a presença de hospital próximo ao local de coleta, onde a resistência à tetraciclina pode ter sido adquirida em algum momento pelo contato com estes ambientes.

Poeta et al. (2005) verificaram a presença do gene *tetM* em enterococos isolados de material fecal de aves, mamíferos e outros animais selvagens de Portugal, independentemente da espécie de enterococos ou do animal de origem. Para Santestevan (2014) nos lobos-marinhos a presença do gene *tetM* foi detectado em 3 dos 10 isolados resistentes à tetraciclina, enquanto Prichula (2015) encontrou este mesmo gene para 8 enterococos com a resistência à tetraciclina confirmada. Ambos os estudos analisaram animais marinhos selvagens.

Cauwerts et al. (2007) propõe que o carregamento de *tetM* é associado ao gene *ermB* em transposons do tipo Tn1545, porém em nosso estudo essa correlação não foi observada, pois a presença do gene *tetM* não pode ser vinculada a nenhum perfil de resistência à eritromicina.

Para Choi & Woo (2015) os *E. faecalis* tetraciclina resistentes de isolados alimentares foram resistentes também a ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina e linezolida. Neste estudo, a resistência da cepa isolada à tetraciclina foi vinculada somente a resistência ao antimicrobiano rifampicina.

Neste trabalho não foram detectadas cepas de enterococos resistentes à vancomicina, apesar de existirem estudos que descrevam a ocorrência destas bactérias resistentes em animais, alimentos e humanos (Lebreton et al., 2014). Os estudos de Jiménez et al. (2013), com amostras de leite materno de diferentes mamíferos, e de Poeta et al. (2005) com animais selvagens, também não detectaram

a presença de enterococos resistentes a vancomicina.

No presente estudo foram encontradas cinco cepas de *E. faecalis* carreando o gene *vanC*<sub>2-3</sub> e uma cepa de *E. faecalis* carreando os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub>. Os genes *vanC*<sub>1</sub> e/ou *vanC*<sub>2-3</sub> são típicos de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, não sendo comum serem identificados em outras espécies. Entretanto, alguns estudos recentes tem detectado estes genes em outras espécies de enterococos. . Schwaiger et al. (2012) detectaram cepas de *E. faecalis* suscetíveis à vancomicina isoladas de porcos na Alemanha, as quais apresentavam o gene *vanC*<sub>1</sub>. Semelhantemente, Moura et al. (2013) analisaram três cepas de *E. faecalis* isoladas de frangos de corte, as quais uma possuía o gene *vanC*<sub>1</sub> e duas possuíam os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2-3</sub>.

Baseado nas conclusões observadas na literatura foi realizado uma PCR para confirmar a identificação dos isolados *E. faecalis* que apresentaram os genes relacionados à resistência à vancomicina e descartar a possibilidade da presença das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, já que estas duas últimas são resistentes intrinsecamente ao antibiótico. Dessa forma, todas as cepas foram confirmadas como *E. faecalis*, sendo possível inferir que estes isolados devem ter adquirido os genes *vanC* através da transferência horizontal de genes. Estando as espécies *E. casseliflavus* (*vanC*<sub>2-3</sub>) e *E. gallinarum* (*vanC*<sub>1</sub>) presentes no trato gastrointestinal de animais, os genes detectados nas amostras em nosso estudo podem ter tido origem no contato entre essas espécies (Poeta et al., 2005; Ali et al., 2013).

Todas as bactérias submetidas ao teste fenotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos foram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolid, nitrofurantoína e vancomicina. Estes antibióticos normalmente estão associados a isolados clínicos, por isso nossas amostras podem não ter demonstrado esse perfil de resistência, mesmo que nos locais de coleta M3 e M4 tenham Hospitais próximos. Provavelmente a disseminação dos genes de resistência não tem alta taxa de distribuição no ambiente (Miller et al., 2014; Moura et al., 2015; Pieniz et al., 2015).

Considerando que o maior número de cepas positivas para os genes de resistência foi isolado da amostra M3, podemos inferir que pelo fato deste local de coleta ser um frigorífico desativado e que anteriormente a desativação do local ocorreu a manipulação de animais, a presença de cepas resistentes pode ter origem

nas fezes destes animais, uma vez que antibióticos, como a eritromicina e tetraciclina, por exemplo, podem ser empregados como promotores de crescimento na ração animal ou até mesmo no tratamento de doenças destes animais.

A resistência antimicrobiana pode ter origens ambientais e ser transmitida sem a pressão seletiva do uso destes compostos, podendo representar a resistência intrínseca de algumas das espécies (Stewart et al., 2014). No caso deste estudo, os morcegos selvagens possuem a presença de enterococos com traços de resistência que pode ser atribuída ao resistoma antimicrobiano. Os organismos que evoluíram sob uma pressão constante de complexidade química são provavelmente a fonte de muitos genes de resistência a antimicrobianos, compreendendo a maior parte do resistoma. Desta forma, os mecanismos de resistência em isolados clínicos podem ter origem no resistoma ambiental, e por isso muitas bactérias ambientais são intrinsecamente resistentes a determinados antibióticos (Wright, 2007).

### 6.3 Fatores de virulência detectados nas amostras de fezes de morcegos

A ampla capacidade de transferência genética e os diferentes mecanismos que permitem aos enterococos carregarem genes que conferem virulência podem contribuir para o aumento destes genes entre espécies (Poeta et al., 2005). Eaton & Gasson (2001) encontraram genes relacionados à virulência em cepas enterocócicas utilizadas como culturas *starter* em alimentos, sugerindo que estes genes não indiquem necessariamente risco da ocorrência de enfermidades. Porém, os fatores de virulência de cepas relacionadas às infecções hospitalares, principalmente em linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium*, são muito estudados. A ampla distribuição de genes de virulência e/ou resistência a antimicrobianos entre cepas das espécies isoladas de leite materno por Jiménez et al. (2013) indica que eles podem constituir um reservatório destes genes e um risco potencial para outros animais (Layton et al., 2010).

A expressão do gene *ace* parece contribuir para a patogênese de infecções, pois facilita a ligação da bactéria com a célula-alvo (Shepard & Gilmore, 2002). O gene *ace* foi o segundo mais frequente fator de virulência encontrado neste trabalho (91,8%), da mesma forma que foi o segundo mais encontrado em amostras de suínos analisadas por Zou et al. (2011). Presente em quase totalidade dos

isolados, o *ace* sempre está em elevada frequência em amostras variadas. Medeiros et al. (2014) analisou amostras provenientes de alimentos e isolados clínicos, onde *ace* foi o segundo gene mais prevalente dentre os fatores de virulência testados. Cariolato et al. (2008) também reportou prevalência semelhante de *ace* em enterococos isolados de amostras humanas e de produtos lácteos. Para Prichula (2015) e Santestevan (2014) a frequência encontrada deste gene foi de 43% e 93,8%, respectivamente, na análise de enterococos isolados a partir de amostras fecais e de fezes de animais selvagens.

Conforme Clewell (1993), a substância de agregação é capaz de mediar uma eficiente transferência de plasmídeo no contato doador-receptor. O gene *agg* aumenta a hidrofobicidade da superfície enterocócica, a qual pode prevenir ou retardar a fagocitose e a subsequente destinação do organismo. Pode se inferir que as cepas deste trabalho possuíam o gene *agg* devido a capacidade que este fator de virulência confere em relação à colonização elevada (Eaton & Gasson, 2001), mantendo as bactérias protegidas e sem muita variação nos tecidos dos hospedeiros. A frequência deste gene no trabalho foi de 49,3% entre os 73 isolados, o que facilitaria a patogenicidade e as ligações entre os *Enterococcus* e o epitélio intestinal entre outras células (Koch et al., 2004; Fischer et al., 2009).

O gene *agg* é responsável pela agregação de bactérias na superfície do tecido do hospedeiro, permitindo a conjugação entre as bactérias. Essas características facilitam a transferência de plasmídeos, adesão às células do hospedeiro e elevam a capacidade de transferir a resistência antimicrobiana (Clewell, 1993; Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004; Fisher & Phillips, 2009; Golińska et al., 2013; Ševc & Franz, 2014). Para Pereira (2016) e Prichula (2015), quando analisados animais selvagens, a frequência do gene da substância de agregação foi de 68,18% e 35,5%, respectivamente. Estes valores foram semelhantes ao obtido neste estudo, indicando perfil semelhante entre animais selvagens. A alta frequência deste gene pode indicar a necessidade de proteção e colonização destas bactérias nas células intestinais do hospedeiro.

Os enterococos portadores do gene *cyIA*, quando acompanhados de outros fatores de virulência, podem proporcionar melhores condições de estabelecimento no ambiente em que vivem e indicam maior potencial de virulência (Camargo et al., 2008). Neste trabalho encontramos a presença do gene *cyIA* somente em 4 cepas da amostra M2. A frequência deste gene quando comparada

ao número total de isolados é de 5,5%. Porém, conforme observado por Pereira (2016) e Santestevan (2014), houve a presença deste gene em enterococos isolados de animais marinhos selvagens nas frequências de 40,9% e 4,9% respectivamente. Esses resultados indicam uma grande variabilidade da presença do gene *cyIA* entre enterococos isolados de animais selvagens. Confirmando a baixa frequência deste gene encontrado nos morcegos, Jiménez et al. (2013) não detectaram *cyIA* nos *E. faecalis* das amostras de leite materno de caninos, felinos e humanos.

Para Zou et al. (2011), em nenhum dos isolados de suínos foram detectados genes *cyIA* e baixas frequências destes genes são descritas nas amostras ambientais e em animais. Enterococos isolados a partir de amostras de água e alimentos demonstraram uma menor quantidade destes genes quando comparados a amostras clínicas conforme Abriouel et al. (2008), o qual também observou ausência deste gene entre isolados de *E. faecalis* provenientes de amostras vegetais e de água. Em estudos epidemiológicos da área clínica, a citolisina tem sido associada com a mortalidade de pacientes, sendo letal para uma ampla gama de células procarióticas e eucarióticas (Coburn & Gilmore, 2003).

A maioria das cepas que contêm os genes da citolisina possui também o gene do fator de agregação, estando estes dois associados aos plasmídeos que respondem aos feromônios, podendo atuar conjuntamente (Mundy et al., 2000). No caso dos enterococos isolados de fezes de morcegos, todos os genes *cyIA* estão relacionados a presença conjunta dos genes *ace*, *agg* e *geE* nas mesmas cepas. Esse resultado indica que estes três genes atuam no auxílio da atividade do gene da citolisina.

O gene *esp* é relatado em grandes proporções em amostras clínicas facilitando a adesão tecidual e contribuindo para colonização e persistência de durante infecções. Conforme Eaton & Gasson (2002), esse gene está presente também em amostras ambientais, porém em menores quantidades. O gene *esp* foi encontrado em baixas proporções neste trabalho, em uma frequência de 2,7% em relação ao número total de isolados. Conforme Abriouel et al. (2008), a elevada incidência do gene *esp* entre isolados clínicos e baixa quantidade entre isolados de alimentos sugere que este gene esteja atuando como potencializador da patogenicidade, facilitando a prevalência de linhagens virulentas anexadas aos tecidos humanos, e talvez este mesmo gene não seja útil em outros ambientes.



O gene *geE* foi observado em 97,3% dos enterococos isolados de fezes de morcegos. Este gene pode degradar direta ou indiretamente a proteína do colágeno ou até mesmo outras proteínas das células do hospedeiro, o que pode causar elevada injúria tecidual. Nos estudos de Pereira (2016) e Santestevan (2014) foram encontradas grandes quantidades de isolados positivos para este gene nos animais selvagens analisados, e as frequências foram de 98,8% e 76,5%, respectivamente.

No estudo de Rathnayake et al. (2012) foram comparadas amostras clínicas e ambientais proveniente de água. O gene *geE* foi observado em maior frequência nas amostras ambientais isoladas da água, chegando a 80% do total de amostras analisadas em *E. faecalis*. A presença deste gene nas bactérias pode ser de extrema importância para a sua sobrevivência dentro do hospedeiro. A elevada incidência dos genes *ace* e *geE* em enterococos isolados de amostras ambientais demonstra que estas estirpes podem abrigar genes de virulência em grandes proporções (Fisher & Phillips, 2009), como observado nos enterococos isolados das fezes de morcegos.

Para os testes fenotípicos realizados, a citolisina foi positiva para todas as amostras contendo o gene *cyIA* (100%), enquanto para *geE* apenas 50,7% das cepas foram capazes de degradar o meio. A análise de enterococos isolados de tartarugas marinhas selvagens de Pereira (2016) não detectou atividade da enzima citolisina dentre seus isolados que foram positivos para o gene *cyIA*. Porém Qin et al. (2000) detectou dentre as cepas que possuíam o gene *geE* que 60% delas eram positivas fenotipicamente para a gelatinase. Eaton & Gasson (2001) destacaram que a ausência de atividade enzimática, tanto para gelatinase quanto para citolisina, pode ser atribuída aos baixos níveis ou *down regulation* da expressão gênica, ou por um produto gênico inativo. Condições ambientais estabelecidas no habitat em que vivem os morcegos também influenciam na expressão gênica. Fatores temporais (como mudanças nas condições físico-químicas do trato gastrointestinal dos hospedeiros) podem tornar genes silenciosos novamente ativos. Além disso, a perda de atividade em condições laboratoriais pode ser um interferente, assim como demonstrado por Lopes et al. (2006) em isolados recuperados a partir de *Enterococcus* sp. congelados.

Os estudos de Poeta et al. (2005) com animais selvagens e de Eaton & Gasson (2001) com isolados clínicos e de alimentos relatam que *E. faecalis* é a

espécie que apresenta o maior e melhor explicado arsenal de fatores de virulência quando comparada às espécies deste gênero. Isso refirma sua elevada presença na patogenicidade. Para Santestevan (2014) quase todos os genes de virulência avaliados foram mais frequentes em isolados de *E. faecalis* em comparação com as outras espécies. A maior incidência de genes de virulência nesta espécie pode indicar seu maior potencial patogênico quando comparada às demais espécies de *Enterococcus* sp. (Santestevan, 2014).

Por ser a espécie mais frequente no TGI dos animais e a mais relacionada com infecções em humanos e animais (Comerlato et al., 2013; Madsen et al., 2017), nossos resultados sugerem que este perfil se mantenha no caso dos morcegos selvagens analisados, sendo as cepas de *E. faecalis* isoladas neste estudo as maiores portadoras de genes de resistência e fatores de virulência. Estes fatores promovem diferentes tipos de vantagens para adesão e permanência nos tecidos do hospedeiro e disseminação dos genes dentre diferentes organismos.

#### 6.4 Análises da distribuição de espécies de *Enterococcus* em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos

Quando as espécies de enterococos foram analisadas nas amostras de DNA total extraídos de fezes de morcegos, foi possível quantificar espécies de enterococos que não haviam sido identificadas nos isolados destas mesmas amostras. As diferenças observadas neste trabalho entre as frequências das espécies podem estar relacionadas às metodologias aplicadas, sendo que técnicas baseadas no cultivo dos micro-organismos são comumente utilizadas na detecção de enterococos ambientais, porém corre-se o risco de suprimir algumas espécies presentes na amostra (Ryu et al., 2013).

A discrepância entre a PCR quantitativa e a contagem de culturas de enterococos foi observada nos efluentes de águas residuais cloradas e águas costeiras no trabalho de He & Jiang (2005). Já se sabia a diferença entre as técnicas, pois o estresse físico pode injuriar as células principalmente com a utilização do cloro na água, entretanto a molécula de DNA pode permanecer presente na amostra, sendo possível a detecção do micro-organismo pela PCR quantitativa (He & Jiang, 2005).

Analisando o DNA total de amostras fecais de animais marinhos selvagens, o trabalho de Medeiros et al. (2016) conseguiu detectar 6 espécies de *Enterococcus*. Neste mesmo trabalho a autora afirma que PCR convencional seguida da PCR quantitativa confere precisão e sensibilidade na detecção de sequências de interesse.

#### 6.5 Detecção de genes de resistência em amostras de DNA total extraídas de fezes de morcegos.

A quantificação total de cópias do gene de resistência em uma amostra permite uma melhor avaliação do efeito de pressões seletivas específicas de que estudos dependentes da prevalência de colônias cultiváveis resistentes aos antibióticos. Por este motivo existe grande diferença entre análise de isolados e do DNA total de amostras (Patterson & Singer, 2006).

Diferentemente dos genes encontrados nas cepas isoladas das fezes de morcegos, no DNA total foi possível detectar a presença dos genes *gyrA*, *vanA* e *vanB*, mesmo com a técnica de PCR convencional sendo aplicada. O gene *gyrA* foi identificado neste trabalho apenas na amostra M1. Na pesquisa de Rathnayake et al. (2011) foram analisadas amostras de águas provenientes do meio ambiente. Por resultados de sequenciamento, cepas resistente-intermediárias não possuíam o gene *gyrA*. No entanto, alterações em aminoácidos foram detectadas em cepas de *E. faecium* que demonstraram perfil fenotípico de resistência à ciprofloxacina. Pode ser por este motivo que exista pouca ou nenhuma quantidade deste gene nas amostras de DNA total, pois analisando os isolados testados para suscetibilidade, verificamos 90% de presença de cepas intermediária-resistentes e apenas 10% de cepas resistentes às quinolonas, nos ofertando um panorama geral da frequência do perfil de resistência presente na amostra. Diversos estudos trazem a presença da resistência a estes antimicrobianos em isolados clínicos (El Amin et al., 1999; Leavis et al., 2006; Piekarska et al., 2008).

As sequências de *vanA* e *vanB* foram detectados apenas nas amostras de DNA total. A presença destes genes está relacionada a perfis de resistência que foram descritos em *E. faecalis* e *E. faecium*, associados a infecções hospitalares e isolados clínicos, principalmente (Cetinkaya et al., 2000; Moura et al., 2015). A não

detecção destes genes nas amostras pode estar relacionada ao fato de que os mesmos estão presentes em outras bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* e *Clostridium* spp. que não foram avaliados no presente estudo (Depardieu et al., 2004; Courvalin, 2006). Pode-se inferir que os genes que conferem resistência à vancomicina presentes nas amostras de DNA total extraído de fezes de morcegos são provenientes do contato destes animais com o ambiente urbano, já que a ação antropogênica pode fazer com que estes genes sejam distribuídos em diferentes ambientes. Sabendo do papel das bactérias nesta distribuição, é possível afirmar que existe uma facilidade em adquirir genes de resistência no meio ambiente, até porque estes genes foram detectados em animais selvagens sinantrópicos neste trabalho.

A proximidade à atividade humana influencia nos perfis de resistência das bactérias intestinais de mamíferos selvagens, embora outras influências possam afetar a frequência da resistência aos antibióticos e não possam ser eliminadas, como, por exemplo, a resistência intrínseca. Estudos atuais demonstram que em amostras de solo, bactérias ambientais são hospedeiras de genes de resistência a antibióticos e que isso independe de atividade humana no local (Allen et al., 2010).

Tanto os genes da resistência clínica quanto os encontrados no ambiente tem potencial para causar a falha no tratamento com uso de antibióticos (Perry et al., 2014). Conforme Gillings & Stokes (2012), as taxas de mutação e transferências de genes são mantidas em equilíbrio pelas mutações ou invasões de elementos de DNA, exceto em condições estressantes, onde a transferência de genes tem vantagem seletiva. Embora a saturação de antibióticos no meio ambiente possa ter sido a força original por trás do aumento da evolutividade, essas implicações se estendem a todos os genes encontrados em ilhas genômicas, incluindo os genes de resistência a antimicrobianos, virulência e transferência horizontal de genes (Perry et al., 2014)

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível isolar enterococos a partir de amostras de *pools* de fezes de morcegos e analisar a diversidade de 4 espécies detectadas pela técnica de PCR convencional e 6 espécies pela técnica de qPCR. Foi avaliado o perfil de suscetibilidade frente a 12 antimicrobianos recomendados, sendo que 5 deles apresentaram perfil de resistência. Foi confirmada a presença de 4 genes de resistência para os isolados que apresentaram este perfil fenotipicamente.

Detectamos a presença de cinco fatores de virulência distribuídos entre as cepas de *Enterococcus* sp. isoladas a partir de fezes de morcegos.

Foi possível determinar e quantificar a presença de diferentes espécies de enterococos utilizando técnicas mais sensíveis e apuradas de biologia molecular. A análise do DNA total teve extrema importância para verificação de espécies e genes de resistência que não foram detectáveis nos isolados de fezes de morcegos.

Como perspectiva, um trabalho mais aprofundado deve ser realizado com o DNA total das amostras de fezes de morcegos, podendo verificar o microbioma e o resistoma destes animais em determinados locais de coleta, tentando, desta forma, abranger um maior número de espécies de enterococos no trabalho bem como analisar demais gêneros presentes nestas amostras.

## 8. REFERÊNCIAS

Aarestrup FM. 2000a. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Suppl.* 101:5-48.

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000b. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 37(2):127-137.

Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, López RL, Grande MJ, Viedma PM, Ortega E, Cañamero MM, Galvez A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology.* 123:38-49.

Ali SA, Hasan KA, Asif HB, Abbasi A. 2013. Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. *Letter in Applied Microbiology.* 58:423-432.

Allen KH, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environment. *Nature Reviews Microbiology.* 8:251-259.

Allen LA, Turmelle A, Mendonça M, Navara K, Kunz T, McCracken G. 2009. Roosting ecology and variation in adaptive and innate immune system function in the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Journal of Comparative Physiology.* 179:315-323.

Anneter G, Stefanello A, Somavilla G, Toscan KH. 2003. **DIETA ALIMENTAR DE TADARIDA BRASILIENSIS (I. GEOFFREY, 1824) – CHIROPTERA: MOLOSSIDAE, EM ÁREA URBANA NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRA DO SUL, RS, BRASIL – DADOS PRELIMINARES.** Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/74433>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

Arita H. 1993. Conservation Biology of the Cave Bats of Mexico. *Journal of Mammalogy*. 74(3):693-702.

Barquez R, Diaz M, Gonzalez E, Rodrigues A, Incháustegui S, Arroyo-Cabrales J. 2015. ***Tadarida brasiliensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T21314A22121621.en>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

Bessa L, Barbosa-Vasconcelos A, Mendes A, Vaz-Pires P, Costa PM. 2014. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of wastewater treatment plant. *Journal of Water Health*. 12:426-435.

Boehm AB, Sassoubre L. 2014. Enterococci as Indicator of Environmental Fecal Contamination. Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al. editores. **Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.** Eye and Ear Infirmary. Boston.

Boehr DD, Lane WS, Wright GD. 2001. Active site labeling of the gentamicin resistance enzyme AAC(6P)-APH(2Q) by the lipid kinase inhibitor wortmannin. *Chemistry & Biology*. 8:791-800.

Brown SP, Cornforth DM, Mideo N. 2012. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiology*. 20:336-342.

Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4):685-706.

Camargo ILBC, Zanella RC, Gilmore MS, Darini ALC. 2008. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:273-278.

Canku Ota. **Mexican Free-tailed Bat**. 2015. Disponível em: <[http://www.turtletrack.org/IssueHistory/Issues15/CO11\\_2015/CO\\_1115\\_Mexican\\_Free-tailed\\_Bats.htm](http://www.turtletrack.org/IssueHistory/Issues15/CO11_2015/CO_1115_Mexican_Free-tailed_Bats.htm)>. Acesso em: 27 dez. 2017.

Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*. 19:886-892.

Cassenego APV, D'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42:480-488.

Cauwerts K, Decostere A, De Graef EM, Haesebrouck F, Pasmans F. 2007. High Prevalence of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates From Broilers Carrying the *erm*(B) gene. *Avian Pathology*. 36(5):395-399.

Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(4):686-707.

Choi JM, Woo GJ. 2015. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*. 70:476-484.

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2):232–260.

Cidade-Brasil. **Município de Tupanciretã**. Disponível em: <<http://www.cidade-brasil.com.br/municipio-tupancireta.html>>. Acesso em: 05 jan. 2018.



Clewell DB. 1993. Bacterial Sex Pheromone-Induced Plasmid Transfer. *Cell*. 73:9-12.

Climate-Data.org. **Clima: São Gabriel**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/location/43784/>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: 26<sup>a</sup> ed. informational supplement M100.

Coburn PS, Gilmore MS. 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolyisin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*. 5(10):661-669.

Comerlato CB, Resende MCC, Caierão J, d'Azevedo PA. 2013. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(5):590-595.

Costa LA. 2016. **Antigo frigorífico serrana de Tupanciretã está próximo a uma definição por parte do governo do RS**. Disponível em: <<https://luisafonsocostatupan.blogspot.com.br/2016/02/antigo-frigorifico-serrana-de.html>>. Acesso em: 08 fev. 2018.

Courvalin P. 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Disease*. 42:S25-S34.

Coutinho VLS, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado ABMP. 2010. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 14(6):564-568.

Cranford J, Fortune D. 1994. Mexican free-tailed bats at Mt. Lake Biological Station. *Virginia Journal of Science*. 45(2):111.

Cui L, Isii T, Fukuda M, Ochiai T, Neoh HM, Camargo ILBC, Watanabe Y, Shoji M, Hishinuma T, Hiramatsu K. 2010. An RpoB Mutation Confers Dual Heteroresistance to Daptomycin and Vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(12):5222-5233.

D'Azevedo PA, Dias CAG, Teixeira LM. 2006. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern regions of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 48(1):11-16.

Davis R, Herreid C, Short H. 1962. Mexican Free-Tailed Bats in Texas. *Ecological Monographs*. 32(4):311-346.

Davis R, Loomis R. 1971. The intranasal Chigger *Mircotrombicula merrihewi* (Acarina: Trombiculidae) in the North American Free-Tailed Bat, *Tadarida brasiliensis*. *The Southwestern Naturalist*. 15(4): 437-458.

Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. 2004. Detection of the *van* Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at Species Level by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(12):5857-5860.

Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificação discrepantes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Dunny GM, Leonard BA, Hedberg PJ. 1995. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *Journal of Bacteriology*. 177(4):871-876.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1):24-27.

Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environment Microbiology*. 67(4):1628-1635.

Eaton TJ, Gasson MJ. 2002. A variant enterococcal surface protein Esp<sub>fm</sub> in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. 216:269-275.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*. 11(5):3196. 359p.

El Amin N, Jalal S, Wretlind B. 1999. Alterations in GyrA and ParC Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(4):947-949.

Emanieni M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, Lari AR. 2016. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 57:E197-E200.

Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. 2004. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:203-207.

Eurobats. 2016. **Importance of bat conservation**. Disponível em: <[http://www.eurobats.org/about\\_eurobats/importance\\_of\\_bat\\_conservation](http://www.eurobats.org/about_eurobats/importance_of_bat_conservation)>. Acesso em: 29 jul. 2016.

Fabian ME, Hartz SM, Arigony THA. 1990. Alimentação de *Tadarida brasiliensis* (Geofroy, 1824) na região urbana de Porto Alegre, RS, Brasil (Choroptera, Molossidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 50(2): 387-392.

Fabian ME, Gregorin R. 2007. **Família Molossidae. In: Morcegos do Brasil** (edited by Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA e Lima IP), Editora UEL, Londrina, p.149-165.

Faldynova M, Videnska P, Havlickova H, Sisak F, Juricova H, Babak V, Steinhauser L, Rychlik I. 2013. Prevalence of antibiotic resistance genes in fecal samples from cattle, pigs and poultry. *Veterinari Medicina*. 58(6):298-304.

FDA, Food. Drug Administration. 1998. **Bacteriological Analytical Manual**. 9th Ed., AOAC Int., Arlington, VA, USA.

Ferguson DM, Moore DF, Getrich MA, Zhouwandai MH. 2005. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology*. 99:598-608.

Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155:1749-1757.

Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106(1):1-24.

Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon, J. 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:365-370.

Furtula V, Jackson CR, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers PA. 2013. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in Area of Intensive Poultry Production. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 10(3):1020-1036.

Gannon M, Kurta A, Rodriguez-Duran A, Willig M. 2005. Bats of Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*. 41(4):882-883.

Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial Resistance in *Enterococci*. Journal of Infections Diseases & Therapy. 2(4).

Gillings MR, Stokes HW. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? Trends in Ecology & Evolution. 27:346-352.

Goel V, Kumar D, Kumar R, Mathur P, Singh S. 2016. Community Acquired Enterococcal Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance Profile in North India. Journal of Laboratory Physicians. 8(1):50-54.

Golinska E, Tomusiak A, Gosiewski T, Wiecek G, Machul A, Mikolajczyk D, Bulanda M, Heczko PB, Strus M. 2013. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology. 19(23):3562-3572.

Google Maps. 2017a. **São Gabriel**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/S%C3%A3o+Gabriel+-+RS,+97300-000/@-30.3337927,-54.6847492,9.5z/data=!4m5!3m4!1s0x950148997f4ea8b9:0xdc6c3098f7eac58f!8m2!3d-30.2915042!4d-54.5218074?hl=pt-BR>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Google Maps. 2017b. **Tavares**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Tavares+-+RS/@-31.317293,-51.5294496,9.92z/data=!4m5!3m4!1s0x9516df3533f81349:0x4ba80ce42a44bbfa!8m2!3d-31.303442!4d-51.0540674?hl=pt-BR>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Google Maps. 2017c. **Tupanciretã**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Tupanciret%C3%A3+-+RS,+98170-000/@-29.0079546,-54.2924515,10z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x94fdfea70f192a6f:0xc15aeb4a49789b53!8m2!3d-29.001375!4d-53.9976775?hl=pt-BR>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Google Maps. 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-30.2973535,-55.8516814,6.71z?hl=pt-BR>>. Acesso em: 02 fev. 2018.

Groms. ***Tadarida brasiliensis***. 2015. Disponível em: <[http://www.groms.de/Species\\_HTMLs/Tbrasili.html](http://www.groms.de/Species_HTMLs/Tbrasili.html)>. Acesso em: 29 dez. 2017.

**Guia de Manejo e Controle de Morcegos:** Técnicas de identificação, captura e coleta. 2012. Centro Estadual de Vigilância em Saúde.

He JW, Jiang S. 2005. Quantification of Enterococci and human adenovirus in environmental samples by real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 71(5):2250-2255.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 6(10):986-994.

Holmberg A, Rasmussen M. 2014. Antibiotic regimens with rifampicin for treatment of *Enterococcus faecium* in biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(1):78-80.

IBGE. 2017a. **Brasil, Rio Grande do Sul, São Gabriel**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/sao-gabriel/panorama>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

IBGE. 2017b. **Brasil, Rio Grande do Sul, Tavares**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/tavares/panorama>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

IBGE. 2017c. **Brasil, Rio Grande do Sul, Tupanciretã**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/tupancireta/panorama>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Ignasiak K, Maxwell A. 2017. Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: prospects for discovering plant-derived antibiotics. *Bio Med Central Microbiology*. 17:1-17.

IUCN. **Red List of Threatened Species**. 2012. Version 2012.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(8):3558-3565.

Jameson D. 1959. A Survey of the Parasites of Five Species of Bats. *The Southwestern Naturalist*. 4(2):61-65.

Jardim MMA. 2008. **Morcegos urbanos: Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais de Porto Alegre**. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Disponível em: <[http://www.groms.de/Species\\_HTMLs/Tbrasili.html](http://www.groms.de/Species_HTMLs/Tbrasili.html)>. Acesso em 29 dez. 2017.

Jensen LB, Frimodt-Müller N, Aarestrup FM. 1999. Presence of erm gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*. 170(1)-151-158.

Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human Milk. *BioMed Central Microbiology*. 13(288).

Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *Journal of Microbiological Methods*. 47(1):11-16.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:3497-3503.

Klibi N, Aouini R, Borgo F, Said LB, Ferrario C, Dziri R, Boudabous A, Torres C, Slama KB. 2014. Antibiotic resistance and virulence of faecal enterococci isolated from food-producing animals in Tunisia. *Annals of Microbiology*. 65:695-702.

Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*. 22:822-830.

Krishnan M, Bharathiraja C, Pandiarajan J, Prasanna VA, Rajendhran J, Gunasekaran P. 2014. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(1):S16-S21.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. **Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance**. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al Editors. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection**. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.

Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW (Eds). 1997. **Color Atlas and Textbook of Diagnostics Microbiology**. Philadelphia, Pa: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers. 5<sup>a</sup> ed. 581 p.

Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. 109:539-547.

Leavis HL, Willems RJL, Top J, Bonten MJM. 2006. High-Level Ciprofloxacin Resistance from Point Mutations in *gyrA* and *parC* Confined to Global Hospital-Adapted Clonal Lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3):1059-1064.

Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Hartke A, Auffray Y, Giard JC. 2009. *ace*, which encodes an adhesion in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. *Infection and Immunity*. 77(7):2832-2839.



Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al Editors. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection**. Massachussets Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.

Lee G. 2013. Ciprofloxacin Resistance in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Male Patients With Complicated Urinary Tract Infection. Korean Journal of Urology. 54:477-481.

Lim KT, Hanifah YA, Yusof MYM, Thong KL. 2012. *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Indian Journal of Medical Microbiology. 30(2):203-207.

Lopes MFS, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJF, Crespo MTB. 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. International Journal of Food Microbiology. 112:208-214.

Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M. 2017. Virulence Factors Associated with *Enterococcus Faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. The Open Microbiology Journal. 11:1-11.

Manero A, Blanch AR. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology. 65(10):4425-4430.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupré I, Sechi LA. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. International Journal of Food Microbiology. 88:291-304.

Martin JD, Mundt JO. 1972. Enterococci in Insects. Applied Microbiology. 24(4):575-580.

Martins-Leite L, Mahu MI, Costa AL, Bessa LJ, Vaz-Pires P, Loureiro L, Niza-Ribeiro J, Matos AJF, Costa PM. 2015. Prevalence of antimicrobial resistance in faecal enterococci from vet-visiting pets and assessment of risk factors. *Veterinary Record*. 176.

McCracken GF, Gillam EH, Westbrook JK, Lee YF, Jensen ML, Balsley BB. 2008. Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*: Molossidae, Chiroptera) at high altitude: links to migratory insect populations. *Integrative and Comparative Biology*. 48(1): 107-118.

McCracken GF, Safi K, Kunz TH, Dechmann DKN, Swartz SM, Wikelski M. 2016. Airplane tracking documents the fastest flight speeds recorded for bats. *Royal Society Open Science*. 3(11).

Medeiros AW. 2011. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon APG. 2014 Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strain in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1):327-332.

Medeiros AW, Amorim DB, Tavares M, Moura TM, Franco AC, d'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2016. *Enterococcus* species diversity in fecal samples of wild marine species as determined by real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(2): 129-136.

Meena S, Mohapatra S, Sood S, Dhawan B, Das BK, Kapil A. 2017. Revisiting Nitrofurantoin for Vancomycin Resistant Enterococci. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11(6):DC19-DC22.

Messi P, Guerrieri E, Niederhäusern S, Sabia C, Bondi M. 2006. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*. 107:218-222.

Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 12(10):1221-1236.

Mohamed JA, Huang DB. 2007. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 56(12):1581-1588.

Moore DF, Guzman JA, McGee C. 2008. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *Journal of Applied Microbiology*.

Moura TM, Cassenego APV, Campos FS, Ribeiro AML, Franco AC, d'Azevedo PV, Frazzon J, Frazzon APG. 2013. Detection of *vanC*<sub>1</sub> gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. 108(4).

Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, d'Azevedo PV, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5):617-621.

Mundt JO. 1963. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Journal of Applied Microbiology*. 11(2):136-140.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(4):513-522.

Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2).

Murray BE. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(1):46-65.

Ness IF, Dzung BD, Yasuyoshi I. 2014. **Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>>. Acesso em: 30 jul. 2016

Nicholson WL, Maughan H. 2002. The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 184(17):4936-4940.

Patterson SK, Singer RS. 2006. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of antibiotic resistance genes in community DNA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18:172-181.

Pereira RI. 2016. **Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Perry JA, Westman EL, Wright GD. 2014. The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiology*. 21:45-50.

Pesenti TC, Gomes SN, Rui AM, Müller G. 2014. Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae). *Iheringia, Série Zoologia*. 104(4):451-456.

Petersen A, Jensen LB. 2004. Analysis of *gyrA* and *parC* mutations in enterococci from environmental samples with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *FEMS Microbiology Letters*. 231:73-76.

Piekarska K, Gierczynski R, Lawrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Jagielski M. 2008. Novel Gyrase Mutations and Characterization of Ciprofloxacin-resistant Clinical Strains of *Enterococcus faecalis* Isolated in Poland. Polish Journal of Microbiology. 57(2):121-124.

Pieniz S, Moura TM, Cassenego APV, Andrezza R, Frazzon APG, Camargo FAO, Brandelli A. 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. Food Control.51:49-54.

Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. 2005. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. Journal of Veterinary Medicine. 52:396-402.

Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. 2000. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(4):967-971.

Prefeitura Municipal de São Gabriel. 2017. **Meio Ambiente**. Disponível em: <<https://www.saogabriel.rs.gov.br/Portal/conheca/meioAmbiente.html>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Prefeitura Municipal de Tavares. 2017. **Conheça Tavares: dados gerais**. Disponível em: <<http://www.tavares.rs.gov.br/site/prefeitura/conheca-tavares/dados-gerais/>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Prefeitura Municipal Tupanciretã. 2017. **Dados do Município**. Disponível em: <<http://www.tupancireta.rs.gov.br/pagina/id/63/?dados-do-municipio.html>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Prichula J. 2015. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Tolfo NCC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, d'Azevedo PA, Frazzon APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 105(1):51-57.

Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infection and Immunity*. 68(5):2579-2586.

Radhouani H, Igrejas G, Pinto L, Gonçalves A, Coelho C, Rodrigues J, Poeta P. 2011. Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. *Journal of Environmental Monitoring-Home*. 13(8):2227-2233.

Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. 2011. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance genes profiles. *BMC Microbiology*. 11(201).

Rathnayake IU, Hargreaves M, Huygens F. 2012. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. 35:326-333.

Russo D, Jones G. **Bats as bioindicators:** a introduction. Disponível em: <<http://media.journals.elsevier.com/content/files/1-18084048.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2016.

Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, Noble R, Gourmelon M, Glassmeyer S, Santo Domingo JW. 2013. 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. *Applied Environmental Microbiology*. 79(1):196-204.

Santestevan NA. 2014. **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.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Santestevan NA, Zvoboda DA, Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Moura TM, Medeiros AW, Amorin DB, Tavares M, d'Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South America fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantartic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(12):1935-1946.

Sato TM, Ricardo MCC, Uieda W, Passos FC. 2015. Estrutura da comunidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da Estação Experimental de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 55(1).

Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef K, Fluit AC. 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:891-894.

Schwaiger K, Helmke L, Holzel CS, Bauer J. 2011. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal in Food Microbiology*. 148:191-196.

Schwaiger K, Bauer J, Hörmansdorfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, Bauer-Unkauf I, Bischoff M, Hölzel C. 2012. Presence of the resistance genes *vanC*<sub>1</sub> and *php5* in phenotypically vancomycin and ampicilin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microbiology Drug Resistance*. 18:434-439.

Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. 2005. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of Oral Biology*. 50:575-583.

Seo Y, Lee G. 2013. Antimicrobial Resistance Pattern in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Expressed Prostatic Secretions of Patients With Chronic Bacterial Prostatitis. *Korean Journal of Urology*. 54:388-393.

Sevec P, Franz CMAP. The Genus *Enterococcus*. 2014. In: Holzapfel WH, Wood BJB Editors. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. John Wiley & Sons Ltda. 1ª edição. 175-211.

Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 69(7):4366-4372.

Shankar V, Baghdayan AS, Huycke M, Lindahl G, Gilmore MS. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*. 67(1):193-200.

Shepard BD, Gilmore MS. 2002. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. *Infection and Immunity*. 70(8):4344-4352.

Shil RK, Mojumder S, Sadida FF, Uddin M, Sikdar D. 2014. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Three Phytophagous Insect Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(6):927-932.

Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. 2010. Importance of the collagen adhesion Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathogens*. 6(1):1-13.

Soborg DA, Hendriksen NB, Kilian M, Christensen JH, Kroer N. 2016. Bacterial Human Virulence Genes across Diverse Habitats As Assessed by *In silico* Analysis of Environmental Metagenomes. *Frontiers in Microbiology*. 7:1712



Soborg Da, Hendriksen NB, Kilian M, Kroer N. 2013. Widespread occurrence of bacterial human virulence determinants in soil and freshwater environments. *Applied Environmental Microbiology*. 79:5488-5497.

Sodré MM, Gama AR, Almeida M. 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 52(2):75-81.

Stern CS, Carvalho MGS, Teixeira LM. 1994. Characterization of Enterococci Isolated from Human and Nonhuman Sources in Brazil. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 20:61-67.

Süssmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. 2000. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infection and Immunity*. 68(9):4900-4906.

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(11):2562-2566.

Svoboda P, Choate J. 1987. Natural history of the Brazilian free-tailed bat in the San Luis Valley of Colorado. *Journal of Mammalogy*. 68(2):224-234.

Teixeira LM, Carvalho MG, Shewmaker PL, Facklam RR. Enterococcus, In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Joergensen JH, Landry ML, Warnock DW. 2011. **Manual of Clinical Microbiology**. 10<sup>o</sup> edição. 350-364.

Tejedor-Junco MT, González-Martín M, González NFR, Gutiérrez C. 2015. Identification, antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Enterococcus* spp. strains isolated from Camels in Canary Island, Spain. *Veterinaria Italiana*. 51:179-183.

Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. 2009. REVIEW OF VIRULENCE FACTORS OF ENTEROCOCCUS: AN EMERGING NOSOCOMIAL PATHOGEN. Indian Journal of Medical Microbiology. 27(4):301-305.

Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Topisirovc MKLT, Gálvez A. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food Control. 20:381-385.

Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology. 42(10):4473-4479.

Veikkolanen V, Vesterinen EJ, Lilley TM, Pulliainen AT. 2014. Bats as Reservoir Hosts of Human Bacterial Pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. Emerging Infectious Diseases. 20(6):960-967.

Wang S, Guo Y, Lv J, Qi X, Li D, Chen Z, Zhang X, Wang L, Yu F. 2016. Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. BMC Microbiology. 16:246.

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

Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. 1995. *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. APMIS. 103:225-232.

Wikler MA et al. 2007. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Seventeenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 27(1).

Wild Life & Countryside Services. 2017. **Harp Traps from Faunatech/Ausbat**. Disponível em: <<http://www.wildlifeservices.co.uk/harptraps.html>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

Wilkins K. 1989. Mammalian Species: *Tadarida brasiliensis*. Mammalian Species. 331:1-10.

Williams T, Ireland L, Williams J. 1973. High altitude flights of free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*, observed with radar. Journal of Mammalogy. 54(4):807-821.

Winter AS, Hathaway JJM, Kimble JC, Buecher DC, Valdez EW, Porrás-Alfaro A, Young JM, Read KJH, Northup DE. 2017. Skin and fur bacterial diversity and community structure on American southwestern bats: effects of habitat, geography and bat traits. PeerJ.

Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nature Reviews Microbiology. 5:175-186.

Xuerui L, Xing J, Baoyu L, Wang, P, Liu J. 2012. Use of tuf as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus Enterococcus, Streptococcus, coagulase-negative Staphylococcus, and Lactococcus. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11(31).

Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim MS, Park DS, Yoon C, Nam YD, Kim YJ, Choi JH, Kim JY, Shin NR, Kim SH, Lee WJ, Bae JW. 2014. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. Applied and Environmental Microbiology. 80(17):5254-5264.

Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, Zhou YS, Yang X, Xu CW, Xia QQ. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. New Microbiologica. 34:73-80.