



ARTIGO

## Diversidade, perfis de resistência e virulência de *Enterococcus* spp. em fezes de morcegos urbanos *Tadarida brasiliensis* (Brazilian free-tailed bats)

Letícia da Fontoura Xavier Costa<sup>1</sup>, Tiela Trapp Grassotti<sup>1</sup>, Caroline Rossi Canani<sup>1</sup>, Alessandra Danile de Lira<sup>3</sup>,  
Tiane Martin de Moura<sup>1</sup>, Aline Alves Scarpellini Campos<sup>2</sup>, Jeverson Frazzon<sup>3</sup> e Ana Paula Guedes Frazzon<sup>1\*</sup>

Recebido: 11 de julho de 2018 Recebido após revisão: 24 de junho de 2019 Aceito: 2 de julho de 2019

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/4119>

**RESUMO:** (Diversidade, perfis de resistência e virulência de *Enterococcus* spp. em fezes de morcegos urbanos *Tadarida brasiliensis* (Brazilian free-tailed bats)). O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil dos enterococos em amostras de fezes de morcegos urbanos *Tadarida brasiliensis* coletadas no Rio Grande do Sul. Fezes de morcegos foram coletadas e submetidas à identificação das espécies de enterococos e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos rifampicina, eritromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína e vancomicina. A presença dos genes de resistência (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC*, *vanA*, *vanB*, *vanC<sub>1</sub>*, *vanC<sub>2/3</sub>*, *tetM*, *tetS* e *tetL*) e virulência (*ace*, *agg*, *cylA*, *esp* e *gelE*) foi determinada por PCR. Além disso, o DNA fecal foi extraído e submetido a qPCR e PCR para detectar as espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. mundtii* e os genes de resistência, respectivamente. Foram isolados 73 enterococos, sendo *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii* identificados. Fenótipos de resistência foram observados para rifampicina (n=53), eritromicina (n=32), norfloxacino (n=7), ciprofloxacino (n=6) e tetraciclina (n=1). Dos genes de resistência testados nos isolados resistentes, somente os genes *ermC* e *tetM* estavam presentes. Seis *E. faecalis* suscetíveis à vancomicina foram positivos para *vanC<sub>1</sub>* e *vanC<sub>2/3</sub>*. Os genes *gelE*, *ace*, *agg*, *cylA* e *esp* foram detectados nos isolados. Nas amostras de DNA fecal, todas as espécies analisadas e os genes *ermC*, *tetM*, *vanA*, *vanB* e *vanC<sub>2/3</sub>* foram observados. Como conclusão, diferentes espécies de enterococos estão presentes nas fezes de morcegos urbanos de *T. brasiliensis*. A presença de enterococos resistentes nestes animais pode estar relacionada com ação antropogênica e/ou ligada ao resistoma.

**Palavras-chave:** enterococos, *vanA*, virulência, morcegos, antropogênico.

**ABSTRACT:** (Diversity, resistance profiles and virulence of *Enterococcus* spp. from fecal samples of *Tadarida brasiliensis* urban bats (Brazilian free-tailed bats)). We aimed to evaluate the profile of enterococci from fecal samples of urban bats *Tadarida brasiliensis* collected at Rio Grande do Sul state, southern Brazil. Bat feces were collected and subjected to enterococci species identification and antimicrobial susceptibility tests for rifampicin, erythromycin, norfloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, gentamicin, linezolid, nitrofurantoin, and vancomycin. The presence of resistance (*ermA*, *ermC*, *ermB*, *msrC*, *vanA*, *vanB*, *vanC<sub>1</sub>*, *vanC<sub>2/3</sub>*, *tetM*, *tetS*, and *tetL*) and virulence (*ace*, *agg*, *cylA*, *esp*, and *gelE*) genes was determined by PCR. In addition, fecal DNA was extracted and subjected to qPCR and PCR to detect the species *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* and *E. mundtii*, and resistance genes, respectively. A total 73 enterococci were isolated, of which *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. mundtii* were identified. Resistance phenotypes were observed for rifampicin (n= 53), erythromycin (n= 32), norfloxacin (n= 7), ciprofloxacin (n= 6) and tetracycline (n=1). Of the resistance genes tested in resistant isolates, only *ermC* and *tetM* were present. Six vancomycin-susceptible *E. faecalis* were positive for *vanC<sub>1</sub>* and *vanC<sub>2/3</sub>*. Genes *gelE*, *ace*, *agg*, *cylA* and *esp* were detected in the isolates. In fecal DNA samples, all analyzed species and the genes *ermC*, *tetM*, *vanA*, *vanB* and *vanC<sub>2/3</sub>* were observed. We conclude that different species of enterococci are present in feces of *T. brasiliensis* urban bats. The presence of antibiotic-resistant enterococci in those animals may be related to anthropogenic action and/or linked to the resistome.

**Keywords:** Enterococci, *vanA*, virulence, bats, anthropogenic.

### INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera, representada pelos morcegos, é a segunda maior ordem de mamíferos em número de espécies. Atualmente, estima-se que existam mais de 1.300 espécies de morcegos descritas e estas espécies apresentam uma enorme diversidade de hábitos alimentares, podendo ser nectarívoros, insetívoros, onívoros

ou sanguívoros. Os morcegos são os únicos mamíferos capazes de voar e viver em grandes populações coloniais e, além disso, desempenha um papel biológico importante na dispersão de sementes, polinização de plantas e controle de insetos (Fenton & Simmons 2015).

O gênero *Tadarida*, membro da Família Molossidae, possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo do

1. Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS), Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 5400, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [ana.frazzon@ufrgs.br](mailto:ana.frazzon@ufrgs.br)

sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul, incluindo os países: Brasil, Uruguai, Chile e Argentina. Oito espécies do gênero *Tadarida* são descritas, porém na América do Sul somente *T. brasiliensis* é encontrada, sendo a espécie de morcegos mais frequente no Rio Grande do Sul (Fabian & Gregorin 2007, Pesenti *et al.* 2014). Estes morcegos são insetívoros migratórios, podendo consumir entre 200 e 600 insetos por noite, e costumam formar colônias composta de milhares de indivíduos. São animais sinantrópicos, adaptados a viver em ambientes urbanos como sótãos ou forros escuros com condições adequadas de umidade e temperatura. A presença de morcegos com hábitos sinantrópicos, além de causar desconforto para a população, quando infectados por micro-organismos aumentam o risco de transmissão de doenças (Pacheco *et al.* 2010). 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).

A despeito de sua importância ecológica, os morcegos são suscetíveis a diferentes micro-organismos, que inclui vírus, bactérias, fungos e parasitas (Muhldorfer 2013). Até hoje, poucos são os estudos que analisaram a presença de bactérias nas fezes de morcegos, o que provavelmente pode ser explicado devido aos hábitos de migração e a dificuldade na obtenção de amostras (Klite 1965, Veikkolanen *et al.* 2014, Carrillo-Araujo *et al.* 2015). Carrillo-Araujo *et al.* (2015) avaliaram a composição do microbioma fecal de morcegos insetívoros, sanguívoros, nectarívoros e frugívoros e observaram que morcegos com dietas à base de plantas tinham a diversidade do microbioma relativamente baixa, enquanto os sanguívoros e os insetívoros tinham maior diversidade. Veikkolanen *et al.* (2014) detectaram que os gêneros *Leuconostoc*, *Enterobacter*, *Lactococcus* e *Chlamydia* eram os mais frequentemente encontrados em fezes de morcegos insetívoros Daubenton's (*Myotis daubentonii*). Um estudo qualitativo nas bactérias intestinais de três espécies de morcegos neo-tropicais (*Chilonycteris rubiginosa*, *Carollia perspicillata* e *Molossus major*) revelou o grupo *Klebsiella-Aerobacter-Serratia* como o mais frequente, seguido por *Enterococcus* spp. e *Proteus* spp. (Klite 1965).

Os enterococos são habitantes naturais do trato gastrointestinal de humanos e animais, e também podem ser encontrados no solo, água e alimentos (Klein 2003, Poeta *et al.* 2005, Fisher & Phillips 2009, Riboldi *et al.* 2009, Garrido *et al.* 2014, Medeiros *et al.* 2014, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016). O gênero *Enterococcus* inclui, de acordo com evidências moleculares e filogenéticas, mais de 50 espécies, sendo *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii* as espécies frequentemente encontradas no trato gastrointestinal de animais (Poeta *et al.* 2005, Lebreton *et al.* 2014, Santestevan *et al.* 2015,

Prichula *et al.* 2016). No entanto, pouco se sabe sobre a presença destas espécies em morcegos (Klite 1965).

Muitas espécies deste gênero são intrinsecamente resistentes aos agentes antimicrobianos comumente utilizados contra cocos Gram-positivos, como cefalosporina, ácido nalidíxico, e baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina (Lebreton *et al.* 2014). Enterococos resistentes a antimicrobianos tem sido isolados de diferentes fontes (Riboldi *et al.* 2009, Cassenego *et al.* 2011, Benani *et al.* 2012, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016) e dados epidemiológicos sugerem que este gênero serve como importante reservatório de genes de resistência a antibióticos e que pode transmitir estes genes para outras espécies bacterianas, incluindo espécies patogênicas (Eaton & Gasson 2001, Gilmore *et al.* 2013). Desta forma, a presença dos enterococos tem sido investigada e monitorada em diferentes habitats, fornecendo informações importantes sobre as interações e perturbações ambientais associadas a eles (Barros *et al.* 2011, Dada *et al.* 2013, Ahmad *et al.* 2014, Radhouani *et al.* 2014).

Embora os morcegos tenham sido indicados como reservatórios de agentes patogênicos humanos, o conhecimento sobre o impacto dos micro-organismos hospedeiros dos morcegos é limitado para a maioria das espécies microbianas. Com base nestes dados, o objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição, a resistência e o perfil de virulência de *Enterococcus* spp. em amostras fecais de morcegos urbanos *T. brasiliensis*. A análise dos enterococos nesses animais também pode indicar o impacto das atividades humanas sobre o meio ambiente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras fecais de morcegos

Armadilhas foram colocadas sob colônias de morcegos que estavam pendurados no teto de três localidades do Estado do Rio Grande do Sul. *Pools* de fezes foram coletados com auxílio de colheres estéreis, acondicionados em microtubos estéreis e refrigerados.

O primeiro local de coleta foi em uma construção inacabada de um Hospital no município de Tavares, RS, Brasil (31°17'16,0"S, 51°05'38,0"O). A colônia tinha cerca de 3.000 animais. Neste local foram realizadas duas coletas, sendo a primeira em 01 de dezembro de 2015 (amostra M1) e a segunda em 10 de março de 2016 (amostra M2). O segundo local de coleta estava situado em um frigorífico desativado no município de Tupanciretã, RS, Brasil (29°04'27,0" S, 53°50'21,0"O). A colônia continha cerca de 700 animais e a amostra foi coletada em 16 de junho de 2015 (amostra M3). O último local de coleta era uma construção inacabada de um posto de saúde no município de São Gabriel, RS, Brasil (30°20'10,19"S, 54°19'43,86"O). A colônia continha cerca de 10.000 indivíduos e a amostra foi coletada em 4 de julho de 2016 (amostra M4).

### Determinação das espécies de enterococos nas amostras de fezes de morcegos

A determinação das espécies foi realizada por métodos de isolamento e identificação convencional e técnicas moleculares.

### Isolamento e identificação das espécies de enterococos por método convencional

Os pools das fezes de morcegos (0,1 g) foram colocados em tubos contendo 1 mL de água peptonada e incubados a 35 °C durante 24 h. O isolamento e a determinação das espécies foi realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme protocolo descrito por Santestevan *et al.* (2015) e Prichula *et al.* (2016) (Tab. 1).

### Determinação das espécies de enterococos por PCR em tempo real (qPCR) no DNA fecal

A detecção e quantificação de enterococos nas amostras no DNA fecal dos morcegos foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) (Tab. 1), e seguiu o protocolo estabelecido por Medeiros *et al.* (2016). O DNA fecal foi extraído a partir de 0,1 g do pool de fezes dos morcegos de acordo com protocolo do comerciante MO BIO's Power Fecal DNA Isolation Kit (Qiagen®), e sua pureza foi verificada e analisada utilizando o equipamento NanoDrop nd-1000 UV (NanoDrop, Wilmington®).

### Resistência aos antimicrobianos associada com enterococos nas amostras de fezes de morcegos

A avaliação da resistência aos antimicrobianos foi determinada pelos métodos convencional e de técnicas moleculares.

### Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção dos genes de resistência nos isolados

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados foi avaliado por meio do teste de disco-

-difusão em ágar, determinado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2016). Doze antibióticos comumente utilizados na medicina clínica e veterinária foram avaliados: ampicilina (AMP - 10 µg), ciprofloxacino (CIP - 5 µg), cloranfenicol (CLO - 30 µg), eritromicina (ERI - 15 µg), gentamicina (GEN - 120 µg), linezolida (LIN-30 µg), nitrofurantoína (NIT - 300 µg), norfloxacino (NOR - 10 µg), estreptomicina (EST - 300 µg), tetraciclina (TET - 30 µg), rifampicina (RIF - 5 µg) e vancomicina (VAN - 30 µg). As cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 53519 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. O perfil de multirresistência foi classificado de acordo com EFSA & ECDC (2013). Foram considerados isolados multidroga resistentes (MDR) os que apresentaram resistência ou resistência intermediária a três ou mais antimicrobianos de classes distintas.

Os isolados resistentes foram examinados por PCR quanto à presença de genes de resistência (Tab 2.) Resistência à eritromicina (genes *ermA*, *ermB* e *ermC* conferem modificação do alvo por meio da codificação de uma metiltransferase que age em resíduos específicos da subunidade 23S rRNA e o gene *msrC* codifica uma bomba de efluxo de macrólido e estreptogramina B); resistência à tetraciclina (o gene *tetL* codifica a mediação de efluxo dependente de energia e os genes *tetM* e *tetS* codificam a resistência através de um mecanismo protéico de proteção ribossômica).

Os isolados com resistência intermediária à vancomicina pela técnica de disco difusão em ágar foram avaliados pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM) para presença dos genes *vanA* e *vanB*, os quais conferem elevada resistência à vancomicina, e os genes *vanC<sub>1</sub>* e *vanC<sub>2/3</sub>*, que codificam resistência intrínseca à vancomicina.

O DNA genômico dos isolados resistentes foi extraído

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para confirmação de gênero e espécies de *Enterococcus* spp.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Amplicom (pb)	TA	Referência
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	55 °C	Ke <i>et al.</i> (1999)
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
CA1	TAGGATGTTACGTCTGCGTG	139	58 °C	Medeiros <i>et al.</i> (2016)
CA2	TTGTTGGTTTGGGCTTTCCCG			
E16S 72f	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG	136	66 °C	Sedgley <i>et al.</i> (2005)
E16S 210r	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC			
<i>E. faecium</i> F	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	172	62 °C	Medeiros <i>et al.</i> (2016)
<i>E. faecium</i> R	CGGAAGTGATGCTTCCTACTG			
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTTCG	173	52 °C	Jackson <i>et al.</i> (2004)
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
HiR1	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA	180	62 °C	Prichula <i>et al.</i> (2016)
HiR2	TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC			
MU1	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	98	60 °C	Jackson <i>et al.</i> (2004)
MU2	GCCATGATTTCCAGAAGAATG			

Abreviaturas: pb, pares de bases; TA, Temperatura de anelamento; Ent, gene *tuf*; CA, *E. casseliflavus*; E16S, *E. faecalis*; *E. faecium*, *E. faecium*; GA, *E. gallinarum*; HiR, *E. hirae*; MU, *E. mundtii*.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de genes de resistência e fatores de virulência.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Amplicom (pb)	TA	Referência
<b>Genes de Resistência</b>				
<i>ermA</i> F	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	420	52 °C	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>ermA</i> R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT			
<i>ermB</i> F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	547	52 °C	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>ermB</i> R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
<i>ermC</i> F	TCAAAAACATAATATAGATAAA	837	52 °C	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>ermC</i> R	GCTAATATGTTTAAATCGTCAAT			
<i>msrC</i> 3	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG	343	52 °C	Werner <i>et al.</i> (2001)
<i>msrC</i> 4	GTAAACAAAATCGTTCGCCG			
<i>tet(L)</i> F	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC	625	58 °C	Frazzon <i>et al.</i> (2010)
<i>tet(L)</i> R	TGTAACCTCCGATGTTAACACG			
<i>tet(M)</i> F	GTAAATAGTGTCTTGGAG	657	52 °C	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(M)</i> R	CTAAGATATGGCTCTAACAA			
<i>tet(S)</i> F	TGGAACGCCAGAGAGGTATT	720	58 °C	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(S)</i> R	ACATAGACAAGCCGTGACC			
<i>vanA</i> F	TAATTGAGCAGGCTGTTTCG	80	56 °C	Moura <i>et al.</i> (2013)
<i>vanA</i> R	TACTGCAGCCTGATTTGGTC			
<i>vanB</i> F	ATGGGAAGCCGATAGTC	635	54 °C	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanB</i> R	GATTCGTTCCCTCGACC			
<i>vanC</i> <sub>1</sub>	GGTATCAAGGAAACCTC	822	54 °C	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanC</i> <sub>1</sub>	CTTCCGCCATCATAGCT			
<i>vanC</i> <sub>2/3</sub> F	CTCCTACGATTCTCTTG	439	54 °C	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanC</i> <sub>2/3</sub> R	CGAGCAAGACCTTTAAG			
<b>Fatores de virulência</b>				
<i>ace</i> F	AAAGTAGAATTAGATCACAC	320	50 °C	Manu <i>et al.</i> (2003)
<i>ace</i> R	TCTATCACATTCGGTTGCG			
<i>agg</i> TE3	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	60 °C	Eaton & Gasson (2001)
<i>agg</i> TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			
<i>cylA</i> TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517	54 °C	Eaton & Gasson (2001)
<i>cylA</i> TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA			
<i>esp46</i>	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	913	60 °C	Shankar <i>et al.</i> (1999)
<i>esp47</i>	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			
<i>gelE</i> F	ACCCCGTATCATTGGTTT	402	50 °C	Eaton & Gasson (2001)
<i>gelE</i> R	ACGCATTGCTTTTCCATC			

Abreviaturas: pb, pares de bases; TA, Temperatura de anelamento; *Genes de resistência*: *ermABC/msrC*, genes de resistência à eritromicina; *tetLMS*, genes de resistência à tetraciclina; *vanABC<sub>1,2,3</sub>*, genes de resistência à vancomicina. *Fatores de virulência*: *ace*, adesão ao colágeno em enterococos; *agg*, substância de agregação; *cylA*, citolisina; *esp*, proteína de superfície em enterococos; *gelE*, gelatinase.

segundo o protocolo Depardieu *et al.* (2004). As ampliações foram conduzidas como descritas em estudos anteriores (Sutcliffe *et al.* 1996, Aarestrup *et al.* 2000, Werner *et al.* 2001, Frazzon *et al.* 2010, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016).

*Avaliação da presença de genes relacionados à resistência nas amostras de DNA fecal de morcegos por PCR convencional*

Para verificar a presença dos genes de resistência *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB*, *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2/3</sub> no DNA fecal de morcegos foi utilizada a técnica de PCR convencional. As amostras eram

somente consideradas negativas quando o resultado da segunda PCR, a qual utilizava 1 mL da reação da primeira PCR como DNA molde, também era negativo. Foram utilizadas cepas como controles positivos para todos os genes testados (Frazzon *et al.* 2010, Medeiros *et al.* 2014, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016).

*Triagem dos fatores de virulência nas espécies de enterococos isoladas*

A partir do DNA genômico extraído de isolados pela técnica de Depardieu *et al.* (2004) foram testados a presença dos genes de virulência *cylA* (citolisina), *gelE* (gelatinase), *ace* (adesina de colágeno), *agg* (substância de

agregação) e *esp* (proteína de superfície de enterococos) por PCR. As amplificações destes genes foram realizadas conforme descritas em estudo anterior por Medeiros *et al.* (2014). As cepas utilizadas como controles positivos foram as mesmas de Medeiros *et al.* (2014) e Santestevan *et al.* (2015). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados na Tabela 2.

Os testes fenotípicos das enzimas gelatinase e hemolisina foram avaliados em todos os isolados de enterococos. As metodologias empregadas foram as mesmas já descritas por Marra *et al.* (2007) e Semedo *et al.* (2003).

#### Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 18.0. O teste exato de Fisher foi realizado e os valores de  $p < 0.05$  foram considerados como estatisticamente significantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Diversidade de espécies de *Enterococcus* em amostras fecais de morcegos urbanos *T. brasiliensis*

Setenta e três enterococos foram isolados de amostras fecais de morcegos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada (83,6%;  $n=61$ ), seguida por *E. casseliflavus* (13,7%;  $n=10$ ), *E. gallinarum* (1,4%;  $n=1$ ) e *E. mundtii* (1,4%;  $n=1$ ). As espécies *E. faecium* e *E. hirae* não foram isoladas destas amostras. Para qPCR, todas as seis espécies testadas foram detectadas no DNA fecal. A média do número de espécies de enterococos no DNA fecal variou, pois enquanto relativamente altas proporções das espécies de *E. faecalis* ( $3,27 \times 10^3$  cópias. $\text{ng}^{-1}$  de DNA fecal), *E. gallinarum* ( $1,69 \times 10^2$  cópias. $\text{ng}^{-1}$  de DNA total) e *E. casseliflavus* ( $4,5 \times 10^1$  cópias. $\text{ng}^{-1}$  de DNA fecal) foram detectadas, as espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. mundtii* se mostraram abaixo do limite de detecção e não foram quantificadas.

A distribuição de espécies de *Enterococcus*, bem como as diferenças nas proporções de cada nicho, podem variar de acordo com características individuais como idade, habitat, variações sazonais, dieta, e localização geográfica (Lebreton *et al.* 2014). Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com a literatura sobre a prevalência de espécies de enterococos no trato gastrointestinal de animais (Poeta *et al.* 2005, Messi *et al.* 2006, Cassenego *et al.* 2011, Byappanahalli *et al.* 2012, Ali *et al.* 2013, Lebreton *et al.* 2014). *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais abundante neste estudo, e a sua prevalência já é considerada comum em amostras fecais de animais conforme estudos já realizados (Poeta *et al.* 2005, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016). As espécies *E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* estão relacionadas com plantas e insetos (Byappanahalli *et al.* 2012, Boehm & Sassoubre 2014), e a presença destas espécies nas fezes dos morcegos pode estar associada ao movimento dos morcegos entre as árvores e a vegetação, além da dieta insetívora destes animais. Análises estatísticas mostraram que *E. casseliflavus* ( $p = 0.003$ ) e *E. faecalis* ( $p = 0.004$ )

foram significativamente diferentes na amostra menos urbanizada, quando comparadas às amostras provenientes de áreas mais urbanizadas.

Neste estudo, a técnica de qPCR detectou a presença de seis diferentes espécies de enterococos. Os métodos comumente usados para identificar as espécies de enterococos de diferentes amostras são baseados no isolamento e cultivo de células, entretanto estas metodologias podem subestimar algumas das espécies presentes nesta comunidade bacteriana. Medeiros *et al.* (2016), utilizando a técnica de qPCR, detectaram a presença de diferentes espécies de enterococos em amostras fecais de animais marinhos selvagens. A discrepância entre metodologias clássicas e moleculares foi também observada por He & Jiang (2005). O DNA de células injuriadas pode permanecer presente na amostra, sendo possível a detecção de células inviáveis de micro-organismos pela qPCR (He & Jiang 2005).

### Perfil de resistência a antimicrobianos dos enterococos

Entre os 73 isolados de enterococos, 30 (41,1%) demonstraram resistência a um antibiótico, 27 (37%) a dois e a quatro (5,5%) demonstraram resistência múltipla. Resistência à rifampicina foi a mais frequentemente observada (72,6%;  $n=53$ ), seguida por eritromicina (43,8%;  $n=32$ ), norfloxacino (9,6%;  $n=7$ ), ciprofloxacino (8,2%;  $n=6$ ) e tetraciclina (1,4%;  $n=1$ ). Nenhum dos isolados analisados demonstrou resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína ou vancomicina.

Dos 32 isolados resistentes à eritromicina, 28 (87,5%) foram positivos para o gene *ermC* (Tab. 3). Os genes *ermA*, *ermB* e *msrC* não foram detectados. O isolado resistente à tetraciclina foi positivo apenas para o gene *tetM* (Tab 3). Um resultado muito interessante foi que 12 isolados de *E. faecalis* que apresentavam perfil de suscetibilidade para a vancomicina pela MIC e resistência intermediária à vancomicina pelo disco difusão em ágar foram testados para os genes de resistência à vancomicina, sendo um deles positivo para os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2/3</sub> e 5 positivos para o gene *vanC*<sub>2/3</sub>.

Entre os doze genes de resistência avaliados nas amostras de DNA fecal por PCR convencional, os genes *tetM*, *vanA*, *vanB* e *vanC*<sub>2/3</sub> foram detectados em uma das quatro amostras analisadas, e o gene *ermC* foi detectado em duas das quatro amostras analisadas de DNA fecal (Tab. 4)

Bactérias resistentes a antibióticos isoladas de morcegos são um tema de grande preocupação, pois estes animais não têm histórico de uso terapêutico de antibióticos. A elevada frequência de isolados resistentes à rifampicina em morcegos insetívoros pode estar relacionada aos seus hábitos alimentares. Ignasiak & Maxwell (2017) encontraram bactérias resistentes à rifampicina em intestinos de insetos e observaram uma ampla variedade de resistência aos antibióticos nestes hospedeiros. Enterococos resistentes aos macrolídeos são comumente

**Tabela 3.** Genes de resistência em enterococos isolados de amostras fecais de morcegos urbanos *T. brasiliensis*.

Amostras	Espécies (n)	Eritromicina		Tetraciclina	
		n <sup>1</sup>	n <sup>2</sup> (%) ermC	n <sup>1</sup>	n <sup>2</sup> (%) tetM
M1	<i>E. faecalis</i> (15)	9	8 (89)	0	ND
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>9</b>	<b>8 (89)</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>
M2	<i>E. faecalis</i> (15)	6	6 (100)	0	ND
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>6</b>	<b>6 (100)</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>
M3	<i>E. casseliflavus</i> (2)	0	ND	0	ND
	<i>E. faecalis</i> (17)	11	11 (100)	1	1 (100)
	<i>E. gallinarum</i> (1)	0	ND	0	ND
	<i>E. mundtii</i> (1)	1	0 (0)	0	ND
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>12</b>	<b>11 (92)</b>	<b>1</b>	<b>1 (100)</b>
M4	<i>E. casseliflavus</i> (8)	2	0 (0)	0	ND
	<i>E. faecalis</i> (14)	3	3 (100)	0	ND
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>5</b>	<b>3 (60)</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>
<b>Total (%)</b>		<b>32</b>	<b>28 (87,5)</b>	<b>1</b>	<b>1 (100)</b>

Abreviaturas: M1, amostra coletada em 01 de dezembro de 2015 no município de Tavares, RS, Brasil; M2, amostra coletada em 10 de março de 2016 no município de Tavares, RS, Brasil; M3, amostra coletada em 16 de junho de 2015 no município de Tupanciretã, RS, Brasil; M4, amostra coletada em 04 de julho de 2016 no município de São Gabriel, RS, Brasil; n1, Número de isolados com perfil de resistência ao antimicrobiano; n2 (%), Número de amostras positivas para o gene detectado; ND, não determinado.

encontrados em humanos e animais. De acordo com Zou *et al.* (2011), uma elevada frequência de bactérias resistentes à eritromicina foram encontradas em isolados de porcos. Apesar dos genes *ermB* e *msrC* serem os mais comuns entre os enterococos resistentes à eritromicina, estes genes não foram detectados entre os isolados deste estudo (Murray 1990, Kristich *et al.* 2014, Prichula *et al.* 2016), sendo que apenas o gene *ermC* foi observado. A presença do gene é incomum entre enterococos resistentes à eritromicina, e existem poucos trabalhos que observem a presença do gene *ermC* em *E. faecium* e *E. faecalis* (Jensen *et al.* 1999, Chajicka-Wierzchowska *et al.* 2016). No entanto, a presença desse gene tem sido reportada com elevada frequência em *Staphylococcus aureus* (Westh *et al.* 1995, Schmitz *et al.* 2000, Coutinho *et al.* 2010, Lim *et al.* 2012).

Foi verificado apenas um isolado de enterococos resistente à tetraciclina, o qual apresentou o gene *tetM*, sendo este gene o determinante de resistência à tetraciclina mais comum entre os *Enterococcus*. O gene *tetM* tem sido observado em elevada frequência em enterococos provenientes de amostras fecais de animais silvestres

(Poeta *et al.* 2005, Cauwerts *et al.* 2007, Choi & Woo 2015, Prichula *et al.* 2016).

Um resultado muito interessante deste trabalho foi a presença dos genes *vanA* e *vanB* no DNA total das fezes dos morcegos *T. brasiliensis*. Estes genes são os genótipos mais comuns e de maior importância clínica (Courvalin 2006). Enterococos resistentes à vancomicina tem emergido como patógenos nosocomiais de grande importância em todo o mundo, e estes genes foram identificados em *E. faecalis* e *E. faecium* (Cetinkaya *et al.* 2000). Bactérias hospedando os genes *vanA* e *vanB* tem sido isoladas de animais (Torres *et al.* 2003, Lozano *et al.* 2016). A transferência dos genes de resistência *van* de espécies de *Enterococcus* a *Staphylococcus aureus* tem sido demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Logo, a presença dos genes de resistência nas amostras fecais de morcegos com hábitos sinantrópicos é de grade preocupação, uma vez que estes genes de resistência podem ser disseminados no meio ambiente. A não detecção desses genes em enterococos isolados de amostras fecais pode ser explicada de duas formas: (i) nas colônias selecionadas (15 a 20 colônias aleatórias), os enterococos resisten-

**Tabela 4.** Presença e ausência de genes de resistência em amostras de DNA fecal de morcegos urbanos *T. brasiliensis*.

Amostras	Genes de resistência identificados nas amostras de DNA total*				
	<i>ermC</i>	<i>tetM</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i> <sub>2/3</sub>
M1	+	-	-	+	-
M2	+	+	+	-	+
M3	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-

Abreviaturas: M1, amostra coletada em 01 de dezembro de 2015 no município de Tavares, RS, Brasil; M2, amostra coletada em 10 de março de 2016 no município de Tavares, RS, Brasil; M3, amostra coletada em 16 de junho de 2015 no município de Tupanciretã, RS, Brasil; M4, amostra coletada em 04 de julho de 2016 no município de São Gabriel, RS, Brasil; \*: +: positivo para o gene; -: negativo para o gene.

**Tabela 5.** Número (%) de genes de fatores de virulência detectados enterococos isolados de fezes de morcegos urbanos *T. brasiliensis*.

Amostras	Espécies (n)	Numero (%) de gene de virulência				
		ace	agg	cylA	esp	gelE
M1	<i>E. faecalis</i> (15)	15 (100)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	15 (100)
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>15 (100)</b>
M2	<i>E. faecalis</i> (15)	15 (100)	15 (100)	4 (27)	0 (0)	15 (100)
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>15 (100)</b>
M3	<i>E. casseliflavus</i> (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
	<i>E. faecalis</i> (17)	17 (100)	1 (6)	0 (0)	1 (6)	17 (100)
	<i>E. gallinarum</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
	<i>E. mundtii</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>18 (85,7)</b>	<b>2 (9,5)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (9,5)</b>	<b>20 (95)</b>
M4	<i>E. casseliflavus</i> (8)	5 (62,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)
	<i>E. faecalis</i> (14)	14 (100)	4 (28,6)	0 (0)	0 (0)	13 (93)
	<b>Subtotal (%)</b>	<b>19 (86,4)</b>	<b>4 (18,2)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>21 (95,5)</b>
<b>Total (%)</b>		<b>67 (91,8)</b>	<b>36 (49,3)</b>	<b>4 (5,5)</b>	<b>2 (2,8)</b>	<b>71 (97,3)</b>

Abreviaturas: M1, amostra coletada em 01 de dezembro de 2015 no município de Tavares, RS, Brasil; M2, amostra coletada em 10 de março de 2016 no município de Tavares, RS, Brasil; M3, amostra coletada em 16 de junho de 2015 no município de Tupanciretã, RS, Brasil; M4, amostra coletada em 04 de julho de 2016 no município de São Gabriel, RS, Brasil.

tes à vancomicina não foram selecionados ou a célula que carregava o(s) gene(s) estava inviável para cultivo; (ii) estes genes não são exclusivos dos enterococos, estando presentes em outras bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, *Streptococcus bovis* e *Clostridium* sp., as quais não foram avaliadas no estudo (Depardieu *et al.* 2004, Courvalin 2006).

Por outro lado, seis isolados de *E. faecalis* das amostras fecais carregavam os genes *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2/3</sub>. Os genes *vanC* tem sido descritos em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, e poucos estudos têm detectados os genes *vanC* em *E. faecalis*. Schwaiger *et al.* (2012) detectou o gene *vanC*<sub>1</sub> em *E. faecalis* suscetíveis à vancomicina isoladas de porcos na Alemanha. Similarmente, Moura *et al.* (2013) analisaram três *E. faecalis* isolados de frangos de corte, sendo que uma cepa possuía o gene *vanC*<sub>1</sub> e duas o gene *vanC*<sub>1</sub> e *vanC*<sub>2/3</sub>.

#### Fatores de virulência em enterococos isolados de amostra fecais de morcegos *T. brasiliensis*

O gene *gelE* foi detectado com elevada frequência (97,3%; n=71) nos isolados, seguido por *ace* (91,8%; n=67), *agg* (49,3%; n=36), *cylA* (5,5%; n=4) e *esp* (2,8%; n=2) (Tab. 5). Além destes, quatro isolados positivos pra o gene *cylA* foram também positivos para o teste da hemólise em ágar sangue.

A presença do gene *gelE* pode estar relacionada a colonização e a persistência dos enterococos no trato gastrointestinal destes mamíferos. Dos 71 isolados positivos para o gene *gelE*, 37 (50,7%) foram positivos e 34 (46,6%) negativos para o teste da atividade da gelatinase. Eaton & Gasson (2001) apontaram que a ausência da atividade enzimática pode ser atribuída aos baixos níveis ou a regulação negativa da expressão do gene ou um produto de gene inativo. Condições

ambientais estabelecidas no habitat o qual os morcegos vivem também podem influenciar na expressão de genes. Fatores temporais podem tornar genes silenciosos ativos novamente. Qin *et al.* (2000) detectaram o gene *gelE* em enterococos fenotipicamente negativos para a gelatinase.

A ampla capacidade de transferência genética e os diferentes mecanismos os quais permitem os enterococos carregarem genes que conferem virulência pode contribuir para aumentar a distribuição destes genes entre espécies (Poeta *et al.* 2005). Em ambientes complexos, como o trato gastrointestinal de animais e humanos, a adesão bacteriana ao tecido do hospedeiro é crítico para o estabelecimento de uma comunidade bacteriana. Os isolados de *E. faecalis* hospedavam pelo menos um gene codificador dos fatores de virulência avaliados. Este resultado está de acordo com outros estudos (Mundy *et al.* 2000, Koch *et al.* 2004, Poeta *et al.* 2005). Os genes de virulência foram também encontrados nas espécies *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii*, sugerindo que os determinantes de virulência sejam uma característica dos enterococos (Poeta *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2014, Santestevan *et al.* 2015).

O gene *ace* contribui para a patogênese de infecções, uma vez que essa característica facilita a ligação da bactéria ao alvo celular (Shepard & Gilmore 2002). O gene *ace* tem sido associado a infecções causadas por *E. faecalis* (Koch *et al.* 2004). No entanto, a função de *ace* nos enterococos de outras origens ainda não foi esclarecida e até hoje poucos avanços foram feitos para explicar o seu papel nos isolados ambientais. Uma alta frequência do gene *ace* em amostras fecais de animais foram reportadas por Zou *et al.* (2011) e Santestevan *et al.* (2015).

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram a distribuição, resistência a antimicrobianos e

presença de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de morcegos *T. brasiliensis*. Os resultados apresentados nesse trabalho visam contribuir nesse campo crescente, mostrando que a contaminação do ambiente é uma forma de disseminar bactérias resistentes aos animais que habitam esses ambientes, principalmente os que se aproximam dos grandes centros urbanos. Esta situação torna-se demasiadamente preocupante no momento em que são encontradas bactérias comensais com resistência aos antimicrobianos em populações de animais que uma vez não tinham história de exposição terapêutica aos antibióticos, podendo estar relacionadas com ação antropogênica e/ou ligada ao resistoma ambiental. Além disso, a ocorrência de genes de resistência, como à vancomicina, é uma grave preocupação, pontuada pela importância destes animais atuarem como reservatórios e disseminadores de tais determinantes no ambiente.

#### Conformidade com padrões éticos

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

### AGRADECIMENTOS

Somos agradecidos a toda equipe do Centro Estadual de Vigilância em Saúde, da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul pela ajuda na coleta de amostras e dados para o nosso estudo. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (CNPq - # 302574/2017-4, #401714/2016-0 e #303603/2015-1) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M., AGERSO, Y., GERNER-SMIDT, P., MADSEN, M. & JENSEN, L.B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 37(2): 127-137.
- AHMAD, A., DADA, A.C., USUP, G. & HENG, L.Y. 2014. Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. *Mar Pollut Bull*, 82(1-2): 26-38.
- ALI, S.A., HASAN, K.A., ASIF, H.B. & ABBASI, A. 2013. Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. *Lett Appl Microbiol*, 58: 423-432.
- BARROS, J., IGREJAS, G., ANDRADE, M., RADHOUANI, H., LÓPEZ, M., TORRES, C. & POETA, P. 2011. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? *Mar Pollut Bull*, 62(6): 1245-1248.
- BENNANI, M., AMAROUCH, H., OUBRIM, N. & COHEN, N. 2012. Identification and Antimicrobial Resistance of Fecal Enterococci Isolated In Coastal Mediterranean Environments of Morocco. *Eur J Sci Res*, 70(2): 266-275.
- BOEHM, A.B. & SASSOUBRE, L. 2014. Enterococci as Indicator of Environmental Fecal Contamination. In: GILMORE, M.S., CLEWELL, D.B., IKE, Y. & SHANKAR, N. (Eds.). *Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Eye and Ear Infirmary. Boston.
- BYAPPANAHALLI, M.N., NEVERS, M.B., KORAJKIC, A., STALEY, Z.R. & HARWOOD, V.J. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(4): 685-706.
- CARRILLO-ARAUJO, M., TAS, N., ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ, R.J., GAONA, O., SCHONDUBE, J.E., MEDELLÍN, R.A., JANSSON, J.K. & FALCÓN, L.I. 2015. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Front Microbiol*, 19(6): 447.
- CASSENEGO, A.P.V., D'AZEVEDO, P.A., RIBEIRO, A.M.L., FRAZZON, J., VAN DER SAND, S.T. & FRAZZON, A.P.G. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Braz J Microbiol*, 42: 480-488.
- CAUWERTS, K., DECOSTERE, A., DE GRAEF, E.M., HAESBROUCK, F. & PASMANS, F. 2007. High Prevalence of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates From Broilers Carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathol*, 36(5): 395-399.
- CETINKAYA, Y., FALK, P. & MAYHALL, C.G. 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 13(4): 686-707.
- CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W., ZADERNOWSKA, A. & LANIEWSKA-TROKENHEIM, L. 2016. Diversity of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus* Strains Isolated from Ready-to-Eat Meat Products. *J Food Sci*, 81(11): M1-M9.
- CHOI, J.M. & WOO, G.J. 2015. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Curr Microbiol*, 70: 476-484.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2016. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 26 edition informational supplement M100.
- COURVALIN, P. 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin Infect Dis*, 42: S25-S34.
- COUTINHO, V.L.S., PAIVA, R.M., REITER, K.C., DE-PARIS, F., BARTH, A.L. & MACHADO, A.B.M.P. 2010. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. *Braz J Infect Dis*, 14(6): 564-568.
- CRANFORD, J. & FORTUNE, D. 1994. Mexican free-tailed bats as Mt. Lake Biological Station. *Va J Sci*, 45(2): 111.
- DADA, A.C., AHMAD, A., USUP, G. & HENG, L.Y. 2013. Speciation and antimicrobial resistance of *Enterococci* isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environ Monit Assess*, 185(2): 1583-1599.
- DEPARDIEU, F., PERICHON, B. & COURVALIN, P. 2004. Detection of the *van* Alphabet and Identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at Species Level by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42(12): 5857-5860.
- 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. *J Clin Microbiol*, 33(1): 24-27.
- EFSA/ECDC - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND 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: 359p.
- EATON, T.J. & GASSON, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67(4):1628-1635.
- FABIAN, M.E. & GREGORIN, R. 2007. Família Molossidae. In: REIS, N.R., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. (Eds.). *Morcegos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina. p. 149-165.
- FENTON, M.B. & SIMMONS, N.B. 2015. *Bats: a world of science and mystery*. University of Chicago Press.
- FISHER, K. & PHILLIPS, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6): 1749-1757.
- FRAZZON, A.P.G., GAMA, B.A., HERMES, V., BIERHALS, C.G., PEREIRA, R.I., GUEDES, A.G., D'AZEVEDO, P.A. & 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 J Microbiol Biotechnol*, 26: 365-370.
- GANNON, M., KURTA, A., RODRIGUEZ-DURAN, A. & WILLIG, M. 2005. Bats of Puerto Rico. *Caribbean J Sci*, 41(4): 882-883.
- GARRIDO, A.M., GÁLVEZ, A. & PULIDO, R.P. 2014. Antimicrobial resistance in Enterococci. *J Infect Dis Ther*, 2(4): 150-157.
- GILMORE, M.S., LEBRETON, F. & VAN SCHAİK, W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol*, 16(1): 10-16.
- HE, J.W. & JIANG, S. 2005. Quantification of Enterococci and human adenovirus in environmental samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 71(5): 2250-2255.
- IGNASIAK, K. & MAXWELL, A. 2017. Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: prospects for discovering plant-derived antibiotics. *BMC Microbiol*, 17: 1-17.
- JACKSON, C.R., FEDORKA-CRAY, P.J. & BARRETT, J.B. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *J Clin Microbiol*, 42(8): 3558-3565.
- JARDIM, M.M.A. 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, L.B., FRIMODT-MÜLLER, N. & AARESTRUP, F.M. 1999. Presence of erm gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett*, 170(1)-151-158.
- KE, D., PICARD, F.J., MARTINEAU, F., MENARD, C., ROY, P.H., OUELLTE, M. & BERGERON, M.G. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J Clin Microbiol*, 37: 3497-3503.
- KLEIN, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of Enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol*, 88(2): 123-131.
- KLITE, P.D. 1965. Intestinal Bacterial Flora and Transit Time of Three Neotropical Bat Species. *J Bacteriol*, 90(2): 375-379.
- KOCH, S., HUFNAGEL, M., THEILACKER, C. & HUEBNER, J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22: 822-830.
- KRISTICH, C.J., RICE, L.B. & ARIAS, C.A. 2014. Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance. In: GILMORE, M.S., CLEWELL, D.B., IKE, Y. & SHANKAR, N. (Eds.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
- LEBRETON, F., WILLEMS, R.J.L. & GILMORE, M.S. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: GILMORE, M.S., CLEWELL, D.B., IKE, Y. & SHANKAR, N. (Eds.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
- LIM, K.T., HANIFAH, Y.A., YUSOF, M.Y.M. & THONG, K.L. 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 J Med Microbiol*, 30(2): 203-207.
- LOZANO, C., GONZALEZ-BARRIO, D., CAMACHO, M.C., LIMA-BARBERO, J.F., CAMACHO, M.C., DE LA PUENTE, J., HÖFLE, U. & TORRES, C. 2016. Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microb Ecol*, 72: 813–820.
- MANNU, L., PABA, A., DAGA, E., COMUNIAN, R., ZANETTI, S., DUPRÉ, I. & SECHI, L.A. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*, 88: 291-304.
- MARRA, A., DIB-HAJJ, F., LAMB, L., KACZMAREK, F., SHANG, W., BECKIUS, G., MILICI, A., MEDINA, I. & GOOTZ, T. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58: 59-65.
- MEDEIROS, A.W., PEREIRA, R.I., OLIVEIRA, D.V., MARTINS, P.D., D'AZEVEDO, P.A., VAN DER SAND, S., FRAZZON, J. & FRAZZON, A.P.G. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strain in South Brazil. *Braz J Microbiol*, 45(1): 327-332.
- MEDEIROS, A.W., AMORIM, D.B., TAVARES, M., MOURA, T.M., FRANCO, A.C., D'AZEVEDO, P.A., FRAZZON, J. & FRAZZON, A.P.G. 2016. *Enterococcus* species diversity in fecal samples of wild marine species as determined by real-time PCR. *Can J Microbiol*, 63(2): 129-136.
- MESSI, P., GUERRIERI, E., NIEDERHÄUSERN, S., SABIA, C. & BONDI, M. 2006. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int J Food Microbiol*, 107: 218-222.
- MOURA, T.M., CASSENEGO, A.P.V., CAMPOS, F.S., RIBEIRO, A.M.L., FRANCO, A.C., D'AZEVEDO, P.V., FRAZZON, J. & FRAZZON, A.P.G. 2013. Detection of *vanC*<sub>1</sub> gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4).
- MUHLDOERFER, K. 2013. Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health*, 60(1): 93-103.
- MUNDY, L.M., SAHM, D.F. & GILMORE, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 13(4): 513-522.
- MURRAY, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, 3(1): 46-65.
- PACHECO, S.M., SODRÉ, M., ROSA, A.R., BREDT, A., CAVALLINI-SANCHES, E.M., MARQUES, R.V., GUIMARÃES, M.M. & BIANCONI, G. 2010. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. *Chiroptera Neotropical*, 16(1): 630-647.
- PESENTI, T.C., GOMES, S.N., RUI, A.M. & MÜLLER, G. 2014. Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae). *Iheringia, Série Zoologia*, 104(4): 451-456.
- POETA, P., COSTA, D., SÁENZ, Y., KLİBI, 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. *J Vet Med*, 52: 396-402.
- PRICHULA, J., PEREIRA, R.I., WACHHOLZ, G.R., CARDOSO, L.A., TOLFO, N.C.C., SANTESTEVEAN, N.A., MEDEIROS, A.W., TAVARES, M., FRAZZON, J., D'AZEVEDO, P.A. & FRAZZON, A.P.G. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Mar Poll Bull*, 105(1): 51-57.
- QIN, X., SINGH, K.V., WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, 68(5): 2579-2586.
- RADHOUANI, H., SILVA, N., POETA, P., TORRES, C., CORREIA, S. & IGREJAS, G. 2014. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Front Microbiol*, 5: 23.
- RIBOLDI, G.P., FRAZZON, J., D'AZEVEDO, P.A. & FRAZZON, A.P.G. 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*, 40(1): 125-128.
- SANTESTEVEAN, N.A., ZVOBODA, D.A., PRICHULA, J., PEREIRA, R.I., WACHHOLZ, G.R., CARDOSO, L.A., MOURA, T.M., MEDEIROS, A.W., AMORIM, D.B., TAVARES, M., D'AZEVEDO, P.A., FRANCO, A.C., FRAZZON, J. & FRAZZON, A.P.G. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South America fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World J Microbiol Biotechnol*, 31(12): 1935-1946.
- SCHMITZ, F.J., SADURSKI, R., KRAY, A., BOOS, M., GEISEL, R., KÖHRER, K., VERHOEF, K. & FLUIT, A.C. 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 45: 891-894.

- 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 ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist*, 18: 434-439.
- SEDGLEY, C.M., NAGEL, A.C., SHELBURNE, C.E., CLEWELL, D.B., APPELBE, O. & MOLANDER, A. 2005. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol*, 50: 575-583.
- SEMEDO, T., SANTOS, M.A., LOPES, M.F.S., MARQUES, J.J.F., CRESPO, M.T.B. & TENREIRO, R. 2003. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*, 26(1): 13-22.
- SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A.S., HUYPKE, M., LINDAHL, G. & GILMORE, M.S. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, 67(1): 193-200.
- SHEPARD, B.D. & GILMORE, M.S. 2002. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun*, 70(8): 4344-4352.
- SUTCLIFFE, J., GREBE, T., TAIT-KAMRADT, A. & WONDRAK, L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(11): 2562-2566.
- TORRES, C., TENORIO, C., PORTILLO, A., GARCÍA, M., MARTÍNEZ, C., DEL CAMPO, R., RUIZ-LARREA, F. & ZARAZAGA, M. 2003. Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB2*-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. *Microb Drug Resist*, 9: S47-S52
- VEIKKOLANEN, V., VESTERINEN, E.J., LILLEY, T.M. & PULLI-AINEN, A.T. 2014. Bats as Reservoir Hosts of Human Bacterial Pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis*, 20(6): 960-967.
- WERNER, G., HILDEBRANDT, B. & WITTE, W. 2001. The Newly Described *msrC* Gene Is Not Equally Distributed Among All Isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(12): 3672-3673.
- WESTH, H., HOUGAARD, D.M., VUUST, J. & ROSDAHL, V.T. 1995. *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS*, 103: 225-232.
- WILKINS, K. 1989. Mammalian Species: *Tadarida brasiliensis*. *Mammalian Species*, 331: 1-10.
- ZOU, L.K., WANG, H.N., ZENG, B., LI, J.N., LI, X.T., ZHANG, A.Y., ZHOU, Y.S., YANG, X., XU, C.W. & XIA, Q.Q. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol*, 34: 73-80.