

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EM MICOS-
LEÕES-DA-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*)
KUHL, 1820, DE VIDA LIVRE, DURANTE PROGRAMA DE
TRANSLOCAÇÃO NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EM MICOS-
LEÕES-DA-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*)
KUHL, 1820, DE VIDA LIVRE, DURANTE PROGRAMA DE
TRANSLOCAÇÃO NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Selene Dall'Acqua Coutinho

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

SÃO PAULO

2016

lovine, Renata de Oliveira.

Pesquisa de *Escherichia coli* patogênica em micos-leões-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) Kuhl, 1820, de vida livre, durante programa de translocação no Brasil / Renata de Oliveira lovine - 2016.

38 f.: il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Profª. Drª. Selene Dall'Acqua Coutinho.

1. *Escherichia coli*. 2. *Leontopithecus chrysomelas*. 3. EPEC típica e atípica. 4. ExPEC. 5. Resistência antimicrobiana. I. Título. II. Coutinho, Selene Dall'Acqua (orientador).

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EM MICOS-
LEÕES-DA-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*)
KUHL, 1820, DE VIDA LIVRE, DURANTE PROGRAMA DE
TRANSLOCAÇÃO NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: ____/____/____

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Selene Dall'Acqua Coutinho
Universidade Paulista - UNIP

Prof^a. Dr^a. Terezinha Knöbl
Universidade de São Paulo - USP

Dr^a. Monica Aparecida Midolli Vieira
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Dr^a. Fabiana Toshie de Camargo Konno
Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Vania Maria de Carvalho pela sabedoria transmitida, paciência, apoio e por estar presente em toda minha vida acadêmica sem nunca desistir de mim. Muito obrigada por tudo!

À professora Dr^a. Selene Dall'Acqua Coutinho por me amparar, me incentivar a continuar e estar sempre presente em um momento muito difícil da minha vida acadêmica.

À Universidade Paulista por permitir o uso do laboratório de pesquisa para que fosse possível a realização do trabalho, além da oportunidade de obtenção do título de doutor.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro na compra de materiais que foram utilizados no presente estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por fornecer bolsa de doutorado.

À Ph.D. Fabiana Toshie de Camargo Konno por apoiar e disponibilizar seu tempo e conhecimento contribuindo para a realização do meu trabalho.

Às funcionárias Cleide Marques da Silva Santana e Suzana Maria Bezerra que foram de grande importância, pois forneceram todos os materiais utilizados e sempre deram apoio quando necessário.

Especial agradecimento aos colaboradores Marina Galvão Bueno, Cecília Kierulff, Camila Molina, Alcides Pissinatti, José Luiz Catão-Dias que ajudaram na coleta das amostras utilizadas neste trabalho. À bióloga Dr^a. Lika Osugui, por transmitir seus conhecimentos que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda a meus pais (Marilene e Sergio), irmãos (Camila e Rafael), esposo (Ricardo) e amigos que sempre me estimularam e apoiaram na concretização desta etapa de minha vida.

RESUMO

Uma importante ferramenta utilizada para conservação das espécies ameaçadas de extinção é a translocação dos animais selvagens de volta ao seu habitat natural. Para isso, faz-se necessária uma completa avaliação da saúde dos indivíduos, com especial enfoque para patógenos zoonóticos. A presença de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli*, com potencial patogênico e/ou zoonótico, pode ser utilizada como indicador de contaminação ambiental e/ou atividade antropogênica. Foi estudada a presença de *E. coli* patogênicas em micos-leões-dourados - MLCD (*Leontopithecus chrysomelas*) de vida livre, durante programa de translocação desses animais para o sul da Bahia, seu habitat original, uma vez que essa espécie é exótica e invasora do Parque Estadual da Serra da Tiririca (Niterói, Rio de Janeiro). Foram coletados swabs retais de 330 MLCD de 63 diferentes agrupamentos familiares, pesquisando-se marcadores de virulência para cepas diarreio gênicas (genes *eae*, *bfpA*, *stx1* e *stx2*) e extraintestinais (genes *sfa*, *papC*, *papEF*, *hly*, *cnf1*, *iucD*, *fyuA*, *traT*, *cvaC* e *malX*). Determinou-se, ainda, o grupo filogenético (A, B1, B2 e D) e a resistência a antimicrobianos (beta-lactâmicos, quinolonas, cloranfenicol, clotrimazol [sulfametoxazol+trimetoprim], aminoglicosídeos e tetraciclina). Os 63 agrupamentos familiares foram classificados de acordo com a proximidade à população humana: Sítio – 121 indivíduos que viviam em áreas sem interação com o homem, Urbano – 110 indivíduos que ocupavam áreas urbanas, mantendo pouco contato com pessoas e/ou animais domésticos e Outros – 99 indivíduos que interagem com as pessoas e/ou animais domésticos. De um total de 311 cepas de *E. coli* isoladas, 82 foram provenientes de 67 MLCD do grupo Outros (67,7%, 67/99), 115 de 95 indivíduos do grupo Urbano (86,4%, 95/110) e 114 de 98 indivíduos do grupo Sítio (81,0%, 98/121). Em relação aos fatores de virulência pesquisados, 40,8% (127/311) das cepas apresentaram o gene *eae* e, analisando-se os resultados referentes às ExPEC, constatou-se que um total de 50,8% (158/311) das cepas apresentaram pelo menos um gene preditor de fator de virulência, 23,2% (72/311) dois genes, sendo os genes *fyuA* e *traT* verificados em maior percentual, 30,5% (95/311) e 25,7% (80/311), respectivamente. As cepas do grupo Outros se distribuíram igualmente entre os quatro grupos filogenéticos. No Urbano as cepas pertenceram em maior percentual ao grupo filogenético A (50,4% - 58/115) e no Sítio aos grupos A (32,5% - 37/114) e B2 (31,6% - 36/114). Comparando-se a resistência apresentada pelas cepas de *E. coli* nos três grupos, constataram-se, de forma geral, níveis similares de resistência aos antimicrobianos, verificando-se elevada porcentagem de cepas resistentes aos beta-lactâmicos, 43,9%, 33,0% e 39,0%, respectivamente nos grupos Sítio, Urbano e Outros. Multirresistência ocorreu em 4,5% (14/311) das cepas analisadas. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de estudos sanitários durante programas de translocação/relocação de animais selvagens, reforçam que a ação humana parece intensificar a contaminação ambiental com cepas com potencial patogênico e/ou resistentes a antimicrobianos e alertam que o encontro dessas cepas não se limita apenas às áreas com maior impacto antropogênico, estando disseminadas mesmo em locais sem ação direta do homem.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Leontopithecus chrysomelas*. EPEC típica e atípica. ExPEC. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

The translocation of wild animals back to their natural habitat is a very important tool in the conservation of endangered species. In this regard, a thorough health evaluation of the translocated specimens, with special emphasis in zoonotic pathogens, is imperative. The presence of antibiotic resistant *Escherichia coli* with pathogenic and/or zoonotic potential may be used as an indicator of environmental contamination and/or anthropogenic activity. We evaluated the presence of pathogenic *E. coli* in wild Golden-headed Lion Tamarins – GHLT (*Leontopithecus chrysomelas*), an invasive exotic species in the Serra da Tiririca State Park in Niterói, Rio de Janeiro state, Brazil, during a translocation program to return these individuals to their original habitat, in southern Bahia state. We collected rectal swabs of 330 GHLT from 63 distinct family groups to evaluate the presence of virulence markers of diarrheogenic (genes *eae*, *bfpA*, *stx1* and *stx2*) and extraintestinal strains (genes *sfa*, *papC*, *papEF*, *hly*, *cnf1*, *iucD*, *fyuA*, *traT*, *cvaC* and *malX*), filogenetic groups (A, B1, B2 e D) and antimicrobial resistance (beta-lactams, quinolones, chloramphenicol, clotrimazol (thrimetoprim + sulfametoxazol), aminoglycosides and tetracycline). Family groups were classified according with their proximity to human populations: “Sítio” – 121 individuals living in areas free of human interaction; “Urbano” – 110 individuals living in urban areas, with little contact with humans and/or domestic animals; and “Outros” – 99 individuals that interacted with people and/or domestic animals. From a total of 311 isolated *E. coli* strains, 82 belonged to 67 GHLT from group “Outros” (67,7%, 67/99), 115 from 95 individuals from group “Urbano” (86,4%, 95/110) and 114 from 98 individuals from group “Sítio” (81,0%, 98/121). The *eae* gene, a virulence factor, was detected in 40,8% (127/311) of the strains. At least one virulence factor gene was detected in 50,8% (158/311) of the ExPEC strains, and 23,2% (72/311) presented at least two genes - *fyuA* and *traT* had the highest detection levels; 30,5% (95/311) and 25,7% (80/311), respectively. Strains from group “Outros” were equally distributed among all phylogenetic groups. Strains from group “Urbano” were mainly from the phylogenetic group A (50,4% - 58/115), and those from group “Sítio” belonged to groups A (32,5% - 37/114) and B2 (31,6% - 36/114). All three groups of *E. coli* strains presented similar antimicrobial resistance levels and elevated percentage of beta-lactam-resistant strains, respectively, 43,9%, 33,0% and 39,0%, in groups “Sítio”, “Urbano” and “Outros”. Multidrug resistance was detected in 4,5% (14/311) of the evaluated samples. Our results indicate the need to perform sanitary studies during wildlife translocation/relocation programs. Anthropogenic activities may intensify environmental contamination by potentially pathogenic and/or antimicrobial resistant strains, not only limited to areas with increased anthropogenic activity, but also in places free of direct human contact.

Keywords: *Escherichia coli*, *Leontopithecus chrysomelas*. Typical and atypical EPEC. ExPEC. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de micos-leões no território brasileiro	10
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes de virulência, grupo filogenético e resistência antimicrobiana em cepas de E. coli isoladas de MLCD.....	20
Tabela 2 – Cepas de E. coli isoladas de MLCD em diferentes agrupamentos familiares que apresentaram multirresistência	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA	9
2 ARTIGO	15
2.1 Introdução	15
2.2 Materiais e métodos	16
2.2.1 Local e população de estudo	16
2.2.2 Isolamento e identificação.....	17
2.2.3 Pesquisa de fatores de virulência (FV) em isolados de <i>E. coli</i> e classificação nos grupos filogenéticos.....	18
2.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos	18
2.3 Resultados.....	19
2.4 Discussão	22
2.5 Conclusões.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
ANEXOS	35
Certificado UNIP	35
Certificado SISBIO	36

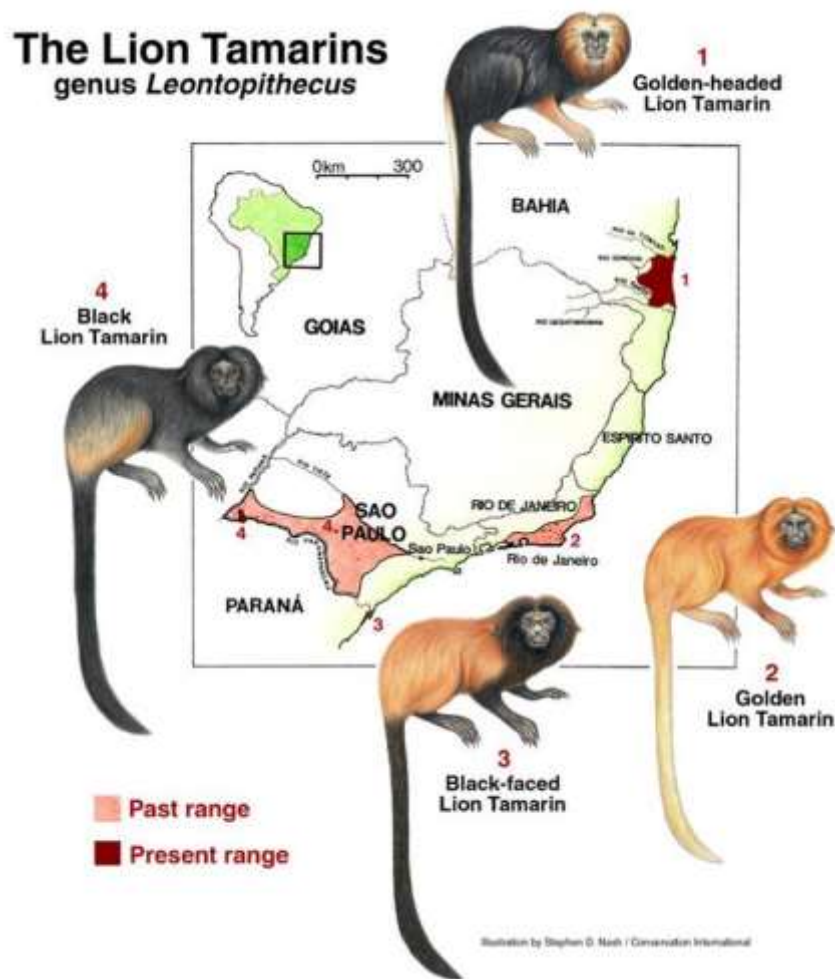
1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA

A Mata Atlântica é uma das florestas mais ameaçadas de extinção no mundo, devido ao intenso desmatamento que vem sofrendo. Apesar disso, abriga grande diversidade de primatas endêmicos, os quais sobrevivem em fragmentos dessa floresta (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009).

O gênero *Leontopithecus* pertence à infra-ordem Platyrrhini (primatas do Novo Mundo) e à família Callitrichidae (VERONA; PISSINATTI, 2007). Seus espécimes são genericamente denominados micos-leões e estão dentre os primatas em maior risco de extinção, sendo classificados em quatro espécies, as quais sobrevivem em áreas restritas no Brasil (Figura 1): o mico-leão-da-cara-dourada (MLCD) (*Leontopithecus chrysomelas*) vive no sul da Bahia e norte de Minas Gerais (1); o mico-leão-dourado (MLD) (*Leontopithecus rosalia*) na região costeira do Rio de Janeiro (2); o mico-leão-da-cara-preta (*Leontopithecus caissara*) em pequena área entre São Paulo e Paraná (3); e o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) no leste do Estado de São Paulo (4) (RYLANDS *et al.*, 2002). Essas espécies são classificadas como EN (*Endangered*) na *Red List of Threatened Species-World Conservation Union* (IUCN, 2016) e na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2003).

Os animais desse gênero possuem como habitat natural diferentes regiões da Mata Atlântica, o que evita a competição por alimentos, moradia, além do surgimento de indivíduos híbridos (RYLANDS *et al.*, 2002).

Figura 1 – Distribuição de micos-leões no território brasileiro



Fonte: reprodução autorizada pelo autor

Estima-se que a população de MLCD na natureza seja formada de 6 a 15 mil indivíduos e de MLD por cerca de 1.600 (RYLANDS *et al.*, 2002). O MLCD é uma espécie exótica invasora no Estado do Rio de Janeiro, foi solta há cerca de 20 anos em uma área de floresta em Niterói, onde se estabeleceu e se expandiu rapidamente. Essa invasão pode comprometer a sobrevivência dos MLD, endêmicos na região. Além disso, o rápido crescimento populacional humano e ações antropogênicas, como agricultura em larga escala, criação de animais domésticos e desmatamento, também acarretam a redução do habitat dos animais e, por consequência, do número de indivíduos (STUMPF *et al.*, 2016).

Em 2011, instituições governamentais e não governamentais uniram esforços para se evitar uma redução ainda maior no número de animais das espécies em questão e decidiram translocar os MLCD, que estavam vivendo no Rio de Janeiro,

para uma floresta preservada e protegida no sul da Bahia, dentro da área de distribuição original da espécie e onde não existia uma população nativa.

Programas de translocação têm importante função na conservação e manutenção das espécies de animais selvagens, principalmente quando há espécies ameaçadas de extinção, como no caso dos micos-leões; entretanto, o sucesso desses programas pode ser baixo, devido à competitividade com animais que já habitam o local, predação e ocorrência de doenças (STUMPF *et al.*, 2016).

Comunidades microbianas de primatas variam de indivíduo a indivíduo, dependendo do habitat, alimentação, idade e ambiente. Essa relação entre o hospedeiro e os microrganismos é importante para a saúde, principalmente se ocorrer interação entre cepas comensais e patogênicas (STUMPF *et al.*, 2016).

Alguns patógenos possuem a capacidade de habitar múltiplos hospedeiros e o ambiente, podendo acarretar a disseminação de doenças zoonóticas (GRIEKSPoor *et al.*, 2013). Além disso, o aumento da virulência do agente pode acontecer quando há transmissão a um novo hospedeiro (DIARD *et al.*, 2010). Portanto, é essencial o estudo sobre a sanidade dos animais a serem translocados, pesquisando patógenos que possam ser transmitidos a outros indivíduos e ao ambiente, minimizando o impacto causado pela translocação e preservando, dessa forma, o novo ambiente e o bem-estar animal (MILLER *et al.*, 2014).

Alguns dos microrganismos pesquisados que impactam a saúde dos animais são parasitas (ex. *Leishmania* spp., *Trypanossoma* spp.), fungos (ex. dermatófitos), vírus (ex. raiva) e bactérias (ex. *Mycobacterium* spp., enterobactérias) (STUMPF *et al.*, 2016). Na família Enterobacteriaceae encontra-se a *Escherichia coli*, patógeno disseminado em humanos, animais e ambiente (RUBTSOVA *et al.*, 2010) e empregado, também, como medida de contaminação ambiental e/ou ação antrópica (CARVALHO, 2007).

Escherichia coli são consideradas comensais intestinais do homem e de outros animais de sangue quente; porém, cepas com potencial patogênico, que surgiram durante o processo evolutivo da espécie, apresentam diversos fatores de virulência, tornando-as capazes de causar tanto doenças entéricas, como extraintestinais (KAPER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007; BÉLANGER *et al.*, 2011).

Escherichia coli diarreiogênica, capaz de causar afecções entéricas no hospedeiro, é subdividida em seis categorias: enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC),

enteroinvasivas (EIEC) e difusamente aderentes (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). Enfatiza-se que as EPEC e as EHEC já foram relacionadas ao homem e aos animais selvagens (CARVALHO *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2009).

As EPEC são importante causa de diarreia e mortalidade em crianças (SHAM *et al.*, 2011). Essas têm, como ponto central de sua patogênese, a capacidade de provocar a lesão *attaching and effacing* (A/E), ocasionando alteração no citoesqueleto da célula epitelial, relacionada ao gene *eae* (NATARO; KAPER, 1998). Em relação aos animais selvagens, a EPEC já foi relatada como agente etiológico de doença em primatas não humanos (MANSFIELD *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003), sendo isolada também de animais de vida livre sadios, como aves, cervídeos e leões marinhos (OH *et al.*, 2011; CARRASCO *et al.*, 2011; OBWEGESER *et al.*, 2012), além de animais de companhia, ruminantes e aves (ISHII *et al.*, 2007).

As EPECs podem ser classificadas em EPEC típica, causadora de diarreia infantil, sendo o homem o único reservatório dessas cepas; e atípica, que também causa diarreia, porém animais e humanos podem ser reservatórios (TRABULSI *et al.*, 2002). O que difere os dois tipos é a presença do gene *bfpA*, responsável pelo fenótipo de aderência específica, encontrada na EPEC típica, o que permite a formação de microcolônias bacterianas na superfície do intestino (OCHOA *et al.*, 2008).

As EHEC são um subgrupo das STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga) e uma das categorias mais estudadas, pois podem resultar em doenças graves como colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica (SHU), doença de elevada letalidade no homem, especialmente crianças, idosos e imunodeficientes (MORA *et al.*, 2004). Bovinos são considerados reservatórios dessas cepas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2003), embora outros animais domésticos e selvagens possam ser portadores assintomáticos (BARDIAU *et al.*, 2010). As cepas desse grupo apresentam alguns marcadores de virulência, entre eles os genes *eae* e *stx1/stx2*, que codificam a produção de toxinas de Shiga (ISHII *et al.*, 2007).

As cepas de *E. coli* envolvidas em processos externos ao sítio intestinal recebem a designação genérica de ExPEC (*Extraintestinal pathogenic E. coli*), sendo o potencial de virulência determinado pela presença de fatores como fimbrias, toxinas, sideróforos, hemolisinas e invasinas (RUSSO; JOHNSON, 2000). Muitos dos fatores de virulência estão presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e ilhas de patogenidade (DIARD *et al.*, 2010). Estudos demonstraram o

isolamento de *E. coli* ocasionando infecção extraintestinal em animais de produção, de companhia, selvagens e humanos, sendo algumas cepas comuns entre os hospedeiros, o que evidencia a transmissão do homem para animais e vice-versa, com participação também do ambiente na transmissão dessas doenças (BÉLANGER *et al.*, 2011).

Embora se disponha na literatura de isolamento de *E. coli* causando doenças extraintestinais (ExPEC) em animais selvagens, são poucos os relatos (CARVALLO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; SCIMECA; BRADY, 1990; NDUNG'U *et al.*, 2003; ORÓS *et al.*, 2004). Em relação aos animais de vida livre, estudos demonstraram que aves selvagens de ambientes insulares e mamíferos selvagens de diferentes biomas brasileiros albergam cepas de ExPEC, com alto potencial patogênico para animais e homem (SAVIOLI *et al.*, 2010).

A diversidade genética das *E. coli* e a observação de que os diferentes patótipos apresentam perfis de virulência distintos, proporcionou a busca de técnicas que possibilitassem a classificação de grupos filogenéticos e a diferenciação entre as cepas comensais e patogênicas (CLERMONT *et al.*, 2000). Análises filogenéticas demonstraram que as *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos principais: A, B1, B2 e D, pertencendo as cepas patogênicas, especialmente as que causam doença extraintestinal, ao grupo B2 e, em menor grau, ao D; enquanto as cepas comensais e menos virulentas, aos grupos A e B1 (SCHIERACH *et al.*, 2008).

A resistência a antimicrobianos ocorre naturalmente nos nichos ambientais, pois é importante na competição e seleção natural de bactérias (BHULLAR *et al.*, 2012); porém a introdução de antimicrobianos para o tratamento e prevenção de infecções bacterianas, além da sua utilização como promotores de crescimento em animais de criação, acarretou o aumento e a disseminação de resistência no mundo todo (ALLEN *et al.*, 2010; SILVA; MENDONÇA, 2012; COSTA *et al.*, 2013), constituindo preocupação na saúde pública (SILVA; MENDONÇA, 2012).

Animais podem ser considerados reservatórios de cepas resistentes com potencial transmissão aos humanos, e vice-versa, por contato direto ou indireto (SILVA; MENDONÇA, 2012). Este fato foi observado em bactérias isoladas de animais selvagens, como aves e mamíferos, que aparentemente não foram expostos a antibióticos, porém apresentaram multirresistência (COSTA *et al.*, 2013).

Preocupação crescente nos dias atuais é também a resistência aos beta-lactâmicos, por ser a classe de antimicrobianos mais utilizada para o tratamento de

infecções bacterianas. Algumas cepas são capazes de produzir enzimas beta-lactamases, que hidrolisam o anel beta-lactâmico, o que resulta na perda da atividade antimicrobiana desse grupo de drogas (RUBTSOVA *et al.*, 2010; LIVERMORE *et al.*, 2012; STEIN *et al.*, 2013). Normalmente os genes que conferem esse tipo de resistência às bactérias estão localizados em plasmídeos, possibilitando rápida e ampla dispersão (RUBTSOVA *et al.*, 2010; HABEEB *et al.*, 2013).

A resistência aos beta-lactâmicos já foi verificada em todos os membros da família Enterobacteriaceae (RUBTSOVA *et al.*, 2010) e tanto animais domésticos como selvagens podem ser reservatórios dessas bactérias e potenciais fontes de genes de resistência (DIERIKX *et al.*, 2010). A disseminação desses genes, principalmente aqueles que conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, mediada pela produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs), são de grande preocupação na atualidade (BLAAK *et al.*, 2014). Estudos demonstram que cepas que apresentam ESBLs também são resistentes a outros antimicrobianos, o que reforça a hipótese da transmissão de resistência por um mesmo plasmídeo, inclusive para diferentes gêneros de bactérias (TRANG *et al.*, 2013).

A multirresistência, fenômeno no qual a bactéria apresenta resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos, pode ser observada em ambiente hospitalar, na comunidade e em animais (SCHULTSZ; GEERLINGS, 2012; IOVINE *et al.*, 2015).

Em vista do exposto, justifica-se o interesse em pesquisar a presença de *E. coli* patogênica em amostras de micos-leões-da-cara-dourada de vida livre, durante programa de translocação da espécie para a Bahia, investigando a presença de fatores de virulência, além da caracterização fenotípica de resistência aos antimicrobianos.

2 ARTIGO

2.1 Introdução

O mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*, MLCD), pertencente à família Callitrichidae, é uma espécie classificada como EN (*Endangered*) pela *Red List of Threatened Species-World Conservation Union* (IUCN, 2016) e pela Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2003). Possui como habitat a região de Mata Atlântica no sul do estado da Bahia e norte do estado de Minas Gerais, porém foi introduzido, se reproduziu e invadiu fragmento de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, habitat natural do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) (RYLANDS *et al.*, 2002), espécie também ameaçada de extinção (IUCN, 2016).

Para minimizar a possível diminuição dos indivíduos de ambas as espécies, causada pela competição por território, alimentos, abrigos para dormir e ocorrência de indivíduos híbridos, foi realizada a translocação dos MLCD de volta ao seu habitat natural no sul da Bahia.

Translocar animais selvagens, principalmente os ameaçados de extinção, é uma ação muito importante para a manutenção das espécies; entretanto, devem ser realizados estudos sanitários desses animais, visando à pesquisa de possíveis patógenos que esses indivíduos possam carrear (MILLER *et al.*, 2014).

Dentre os possíveis patógenos, encontra-se a *Escherichia coli*, bactéria gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, considerada comensal intestinal de humanos e animais de sangue quente (RUBTSOVA *et al.*, 2010). Porém, há cepas patogênicas que podem causar infecções em diferentes hospedeiros, tanto no sítio intestinal, como em sítios extraintestinais (KAPER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007; BÉLANGER *et al.*, 2011).

Dentre as cepas que podem causar afecções intestinais estão as *E. coli* enteropatogênicas - EPEC, importante causadora de diarreia e letalidade em crianças (SHAM *et al.*, 2011) e já relatada como agente etiológico de doença em primatas não humanos (MANSFIELD *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003). Essas bactérias também podem ser isoladas de animais de vida livre saudáveis, como aves, cervídeos e leões marinhos (OH *et al.*, 2011; CARRASCO *et al.*, 2011; OBWEGESER *et al.*, 2012).

Em relação às afecções causadas por cepas de *E. coli* extraintestinais (ExPEC), destacam-se as infecções urinárias, pneumonias, meningites e septicemias (SMITH *et al.*, 2007; CARVALLO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012). Poucos são os relatos em animais selvagens (SCIMECA; BRADY, 1990; NDUNG’U *et al.*, 2003; ORÓS *et al.*, 2004). Entretanto, verificou-se a presença de cepas com potencial patogênico de ExPEC em diferentes espécies de mamíferos selvagens de vida livre em um parque público na cidade de São Paulo (IOVINE *et al.*, 2015) e a presença dessas cepas em aves migratórias (SAVIOLI *et al.*, 2010).

Além da pesquisa de genes de virulência para a classificação das *E. coli*, outra metodologia também utilizada é a análise de grupo filogenético, tendo como objetivo a investigação da origem evolucionária das cepas patogênicas, sendo classificadas nos grupos A, B1, B2 e D (ISHII *et al.*, 2007).

Resistência a antimicrobianos é um evento natural (BHULLAR *et al.*, 2012), porém a utilização indiscriminada dessas drogas no tratamento de doenças bacterianas e como promotores de crescimento em criações de animais domésticos, propiciou aumento e disseminação de resistência por todo o mundo (ALLEN *et al.*, 2010; SILVA; MENDONÇA, 2012; COSTA *et al.*, 2013). Há descrições de bactérias resistentes, inclusive apresentando multirresistência, em animais selvagens, embora os mesmos não tenham sido diretamente expostos a antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2013).

Em vista do exposto, é objetivo deste trabalho pesquisar a ocorrência de *E. coli* patogênica em amostras de micos-leões-da-cara-dourada (*L. chrysomelas*) de vida livre, capturados no Parque Estadual da Serra da Tiririca, no Rio de Janeiro, durante programa de translocação da espécie para a Bahia, investigando a presença de fatores de virulência em amostras de *E. coli* e a caracterização fenotípica de resistência aos antimicrobianos.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Local e população de estudo

Todos os procedimentos de captura e colheita de material foram aprovados pelas instâncias cabíveis, estando amparados nas licenças ambientais requeridas no Brasil (SISBIO nº: 30939-4, emitido em 18/05/2012) (Anexo) e em parecer de Comitê

de Ética para Utilização de Animais em Pesquisa (Protocolo nº: 140/12 CEP/ICS/UNIP) (Anexo).

Foram capturados 330 micos-leões-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) de vida livre, no Parque Estadual da Serra Tiririca, localizado nos municípios de Niterói, Maricá e São Gonçalo, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (22°56` S, 43°00` W). Devido à ocorrência de interface do parque com moradias, os animais capturados foram divididos em três grupos: Sítio, 121 animais que ocupavam áreas rurais, com matas e, aparentemente, nenhuma interação com as habitações humanas; Urbano, 110 animais que ocupavam áreas urbanas, mas não foram observadas interações com pessoas e/ou animais domésticos; e Outros, 99 micos, com observadas interações com pessoas e/ou animais domésticos.

Os animais foram capturados em pequenos grupos com armadilhas *Tomahawk* e contidos quimicamente (cloridrato de cetamina¹ - 10mg/kg + midazolam² - 0,3mg/kg), totalizando 63 famílias. Realizou-se rigoroso exame clínico dos MLCD, os quais permaneceram em quarentena no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro durante o período de realização dos testes laboratoriais e previamente à sua translocação e soltura em uma área de reserva no estado da Bahia (15°59`S, 39°23`W), dentro dos limites territoriais da espécie, mas livre de uma população nativa.

2.2.2 Isolamento e identificação

Para a pesquisa de *E. coli*, foram colhidos 330 *swabs* retais, os quais foram semeados em ágar MacConkey (Difco™), incubados por 24h a 37°C, sendo a caracterização das cepas realizada de acordo com as técnicas rotineiras de identificação bioquímica (KONEMAN *et al.*, 1997), incluindo os *kits* EPM, MILi, Citrato (Probac™).

¹ Cloridrato de cetamina: Dopalen Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, São Paulo Brasil;

² Midazolam: midazolam, Medley, Campinas, São Paulo, Brasil.

2.2.3 Pesquisa de fatores de virulência (FV) em isolados de *E. coli* e classificação nos grupos filogenéticos

Investigaram-se marcadores de virulência nas cepas de *E. coli*, pela técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), sendo os genes *eae*, *stx1* e *stx2*, relacionados às cepas diarreiogênicas (POLLARD *et al.*, 1990; OLSVIK *et al.*, 1991; GANNON *et al.*, 1993) e os genes *sfa*, *papC*, *papEF*, *iucD*, *malX*, *cvaC*, *hly*, *fyuA*, *traT* e *cnf1* relacionados às cepas patogênicas extraintestinais (ExPEC) (LE BOUGUENEC *et al.*, 1992; JOHNSON; STELL, 2000). Além disso, as cepas foram classificadas segundo o grupo filogenético como descrito por Clermont *et al.* (2000) utilizando-se os iniciadores *chuA*, *yjaA* e TSPE4.C2.

Para o gene *bfpA* (*bundle-forming pilus*) foi realizada a técnica de hibridação, utilizando-se fragmentos amplificados específicos de DNA sendo marcados com [α -d-32P]-dATP e, posteriormente, hibridados com as cepas pesquisadas (VIEIRA *et al.*, 2001).

2.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram testados para susceptibilidade aos antimicrobianos, segundo a técnica de difusão em placa, preconizada por Kirby & Bauer, tendo como parâmetros a padronização internacional (CLSI, 2013a; CLSI, 2013b). Multirresistência foi considerada em cepas que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARTZ *et al.*, 2010). Os antimicrobianos testados foram: beta-lactâmicos - amoxicilina 30 µg (AMO), ampicilina 10 µg (AMP), cefalexina 30 µg (CFE), cefoxitina 30 µg (CFO) e ceftiofur 30 µg (CTF); quinolonas - ciprofloxacina 5 µg (CIP) e enrofloxacin 5 µg (ENO); anfenicol - cloranfenicol 30 µg (CLO); clotrimazol 25 µg (Sut) (sulafametoxazol+trimetoprim); aminoglicosídeos - estreptomicina 10 µg (EST) e gentamicina 10 µg (GEN); tetraciclina 30 µg (TET) (Cefar™).

2.3 Resultados

Foram coletados swabs retais de 63 agrupamentos familiares, perfazendo um total de 330 MLCD, sendo 162 (49,0%) fêmeas e 168 (51,0%) machos. Isolaram-se 311 cepas de *E. coli*, com a seguinte distribuição: 82 cepas provenientes de 67 MLCD do grupo Outros (67,7%, 67/99), 115 de 95 indivíduos do grupo Urbano (86,4%, 95/110) e 114 de 98 indivíduos do grupo Sítio (81,0%, 98/121).

Em relação aos FV pesquisados para *E. coli* diarreiogênicas, 40,8% (127/311) das cepas apresentaram o gene *eae*, porém baixo percentual foi verificado para o gene *stx2* (4/311 - 1,3%) e nenhum isolado possuía o gene *stx1*. Não houve concomitância na mesma cepa dos genes *eae* e *stx2*. Entretanto, observou-se a presença do gene *eae* concomitante com o gene *bpfA* em - 3,2% (10/311) dos isolados (Tabela 1). De forma geral não se verificaram diferenças entre os três grupos.

Analisando-se os resultados referentes aos FV de ExPEC, constatou-se que um total de 50,8% (158/311) das cepas apresentaram pelo menos um gene preditor de FV, 23,2% (72/311) dois genes, 10,0% (31/311) três genes, 5,5% (17/311) quatro genes, 4,5% (14/311) cinco genes, 3,2% (10/311) seis genes e 0,6% (2/311) sete genes (dados não apresentados).

Comparando-se os grupos, 8,5% (7/82) de cepas do grupo Outros, 6,1% (7/115) do Urbano e 2,6% (3/114) do Sítio apresentaram três ou mais genes de FV (dados não apresentados). Além disso, constatou-se que o gene verificado em maior percentual foi o *fyuA* com 30,5% (95/311), seguido pelo *traT* com 25,7% (80/311) e *malX* com 16,7% (52/311) (Tabela 1).

As cepas do grupo Outros se distribuíram igualmente entre os quatro grupos filogenéticos. No Urbano, pertenceram em maior percentual ao grupo filogenético A (50,4% - 58/115) e, no Sítio, aos grupos A (32,5% - 37/114) e B2 (31,6% - 36/114) (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes de virulência, grupo filogenético e resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de MLCD

Classificação		Sítio	Urbano	Outros	Total
Número total de cepas		114	115	82	311
Genes de virulência [%/(Nº)]	Intimina				
	<i>eae</i>	35,1/(40)	43,5/(50)	45,1/(37)	40,8/(127)
	Bundle-forming pili				
	<i>bfpA</i>	3,5/(4)	3,5/(4)	2,4/(2)	3,2%/(10)
	Toxina de Shiga				
	<i>stx1</i>	0	0	0	0
	<i>stx2</i>	0,9/(1)	0,9/(1)	2,4/(2)	1,3/(4)
	Adesinas				
	<i>papC</i>	1,8/(2)	4,3/(5)	8,5/(7)	4,5/(14)
	<i>papEF</i>	1,8/(2)	0,9/(1)	4,9/(4)	2,3/(7)
	<i>sfa</i>	3,5/(4)	8,7/(10)	6,1/(5)	6,1/(19)
	Sideróforos				
	<i>fyuA</i>	35,1/(40)	27,8/(32)	28,0/(23)	30,5/(95)
	<i>iucD</i>	0,9/(1)	0	1,2/(1)	0,6/(2)
	Toxinas				
	<i>hly</i>	3,5/(4)	2,6/(3)	3,7/(3)	3,2/(10)
	<i>cnf1</i>	4,4/(5)	7,8/(9)	8,5/(7)	6,8/(21)
	Plasmídeo				
	<i>cvaC</i>	0,9/(1)	0	0	0,3/(1)
	Evasina				
	<i>traT</i>	19,3/(22)	39,1/(45)	15,9/(13)	25,7/(80)
	Ilha de patogenicidade				
	<i>malX</i>	16,7/(19)	20,9/(24)	11,0/(9)	16,7/(52)
Grupo filogenético [%/(Nº)]	A	32,5/(37)	50,4/(58)	29,3/(24)	38,3/(119)
	B1	15,8/(18)	18,3/(21)	26,8/(22)	19,6/(61)
	B2	31,6/(36)	18,3/(21)	23,2/(19)	24,4/(76)
	D	20,2/(23)	12,2/(14)	20,7/(17)	17,4/(54)
Resistência antimicrobiana [%/(Nº)]	Beta-lactâmicos	43,9/(50)	33,0/(38)	39,0/(32)	38,6(120)
	Aminopenicillina	40,4/(46)	32,2/(37)	37,8/(31)	36,7(114)
	Cefalosporina	11,4/(13)	10,4/(12)	8,5/(7)	10,3(32)
	Clotrimazol	1,8/(2)	7,0/(8)	6,1/(5)	4,8(15)
	Quinolonas	0,9/(1)	0,9(1)	2,4/(2)	1,3(4)
	Tetraciclina	3,5/(4)	9,6/(11)	6,1/(5)	6,4(20)
	Aminoglicosídeos	3,5/(4)	10,4/(12)	6,1/(5)	6,8(21)
	Cloranfenicol	0	0	2,4/(2)	0,6(2)

Fonte: Autor

Observou-se que 38,6% (120/311) das cepas de *E. coli* apresentaram resistência aos antibacterianos beta-lactâmicos, seguido de aminoglicosídeos (21/311 - 6,8%), tetraciclina (20/311 – 6,4%) e clotrimazol (15/311 – 4,8%). O menor percentual de resistência ocorreu frente às quinolonas e cloranfenicol 1,3% e 0,6% (4/311 e 2/311), respectivamente (Tabela 1).

Comparando-se a resistência apresentada pelas cepas de *E. coli* dos três grupos (Outros, Urbano e Sítio), constataram-se, de forma geral, níveis similares de resistência aos antibacterianos. Em relação aos beta-lactâmicos, observou-se um percentual ligeiramente superior de resistência no grupo Sítio (43,9%) e maiores índices de resistência aos aminoglicosídeos (10,4%) e tetraciclina (9,6%) no grupo Urbano (Tabela 1).

Ao se analisar os isolados de *E. coli* dos três diferentes grupos, observou-se que 4,5% das cepas (14/311) apresentaram multirresistência, a qual ocorreu em maior percentual no grupo Urbano, particularmente no agrupamento familiar 38 (5/14 – 35,7%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Cepas de *E. coli* isoladas de MLCD em diferentes agrupamentos familiares que apresentaram multirresistência

Agrupamento Familiar	Grupo	Identificação da Cepa	Resistência*
23	Sítio	117/1	Amp, Amo, Est, Tet, Sut
23	Sítio	120/1	Amp, Amo, Est, Tet, Sut
28	Urbano	141/4	Amp, Amo, Cfe, Cfo, Cft, Tet, Sut
35	Sítio	189/4	Amp, Amo, Est, Eno
38	Urbano	218/1	Amp, Amo, Cfe, Cft, Tet
38	Urbano	219/1	Amp, Amo, Cfe, Cft, Tet
38	Urbano	220/1	Amp, Amo, Cfe, Cft, Tet
38	Urbano	221/2	Amp, Amo, Cfe, Cft, Tet
38	Urbano	222/3	Amp, Amo, Cfe, Cft, Tet
40	Outros	244/1	Amp, Amo, Cfe, Est, Sut
40	Outros	248/3	Amp, Amo, Cfe, Cfo, Cft, Clo
41	Urbano	257/1	Amp, Cft, Tet
49	Outros	304/3	Amp, Amo, Cfe, Cfo, Tet
62	Sítio	386	Amp, Amo, Cfe, Cfo, Tet

* Amp - ampicilina; Amo - amoxicilina; Cfe - cefalexina; Cfo - cefoxitina; Cft - ceftiofur; Clo - cloranfenicol; Eno - enrofloxacin; Est - estreptomicina; Tet - tetraciclina; Sut - clotrimazol

Fonte: Autor

2.4 Discussão

A pesquisa de patógenos comuns ao homem e animais e o papel exercido pelo meio ambiente vão ao encontro do conceito *One world – One health*, em que os animais selvagens podem representar importante elo nessa interação (WEINHOLD, 2003; RABINOWITZ *et al.*, 2009).

Segundo Gordon e Cowling (2003), a probabilidade de um hospedeiro albergar *E. coli* dependeria da frequência com que um indivíduo é exposto à bactéria, da probabilidade desse evento de exposição resultar no estabelecimento de uma população e, finalmente, do tempo médio que a população de *E. coli* pode persistir no hospedeiro. Essas informações são relevantes na avaliação do papel de animais selvagens como sentinelas da interação com o homem, uma vez que as *E. coli* têm uma baixa taxa de sobrevivência no ambiente, fora dos seus hospedeiros (WINFILED; GROISMAN, 2003).

Neste projeto, de forma geral, não houve diferença na presença de genes de virulência nos três grupos analisados (Sítio, Urbano e Outros), não sendo detectadas, neste aspecto, alterações da microbiota dos animais quanto à proximidade ou não com o homem. Essa observação não significa que o contato com o homem não interfere na microbiota dos animais selvagens, e sim que deve haver outros mecanismos de disseminação das cepas provenientes do homem que não apenas o contato direto. Estudos têm apontado que o contato com o homem pode determinar a alteração da população de *E. coli* na microbiota intestinal de animais selvagens (GORDON; COWLING, 2003; RWEGO *et al.*, 2008), e que esses podem ser reservatórios de *E. coli* patogênica ao homem (SÁNCHEZ *et al.*, 2010; BÉLANGER *et al.*, 2011; OBWEGESER *et al.*, 2012).

O gene *eae*, marcador de grupo *attaching and effacing E. coli* (AEEC), está relacionado principalmente ao homem, como importante causa de diarreia em crianças, mas já foi detectado em primatas não humanos (MANSFIELD *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003). Isolamento em pássaros, cervídeos e leões-marinhos (BARDIAU *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2011; CARRASCO *et al.*, 2011) foram relatados, aventando-se a hipótese de que os animais selvagens, quando carreando estes patógenos, possam participar da disseminação interespecies desses genes. EPEC típica é isolada de humanos e atípica de animais (ISHII *et al.*, 2007); entretanto, neste trabalho, observou-se a presença do gene *bfpA* em dez isolados (3,2%),

concomitante com o gene *eae*, caracterizando potencial perfil de EPEC típicas nessas cepas. Ressalta-se a importância desse achado em saúde pública e os riscos de infecção do homem pelas cepas oriundas desses micos-leões.

Carvalho et al. (2003) também relataram a presença desses genes em primatas neotropicais de cativeiro; porém, não pertenciam aos sorotipos clássicos de EPEC típica. Sugere-se que, talvez devido uma proximidade filogenética maior entre o homem e os primatas, estes últimos possam se constituir em reservatórios naturais dessas cepas consideradas humanas; cabe ampliar as pesquisas nessa área. Além disso, o aumento na frequência de isolados de EPEC atípica (HERNANDES et al., 2009; MOURA et al., 2009; XU et al., 2016), especialmente em animais domésticos e selvagens, tem grande impacto na saúde pública pela possível transmissão que pode ocorrer entre animais e humanos (MOURA et al., 2009), corroborando os resultados obtidos neste trabalho, com percentual elevado de EPEC atípica nos isolados dos micos.

A hipótese de contaminação ambiental, advinda da ação humana, é sugerida pela presença de, pelo menos, um dos genes marcadores de ExPEC. Esse heterogêneo grupo de *E. coli* patogênica pode colonizar de maneira assintomática o intestino de vários hospedeiros, existindo evidências de que diferentes combinações de genes de virulência possam trazer vantagens competitivas para o estabelecimento dessas bactérias na microbiota intestinal, assim como no desenvolvimento de infecções extra-intestinais (JOHNSON et al., 2003; DIARD et al., 2010; OSUGUI et al., 2014).

Pode-se inferir que haja ampla exposição dos animais a bactérias com esses marcadores, uma vez que alto número das cepas isoladas apresentou algum ou alguns dos genes: *papC*, *sfa*, *cnf1*, *fyuA*, *traT* e *malX*.

Verificou-se elevado percentual dos genes *fyuA*, sideróforo importante para a captação de ferro em ambientes com baixa concentração e *traT*, proteína que confere evasão do sistema imune através da via complemento (JOHNSON, 1991). Usualmente esses genes estão presentes em isolados causadores de meningite neonatal, em infecções nosocomiais em UTIs e, ainda, em doença aviária (BÉLANGER et al., 2011). O significado desses achados para a vida selvagens deve ser melhor avaliado, uma vez que relatos de doenças ocasionadas por ExPEC em animais selvagens são restritas a indivíduos mantidos em cativeiro (CARVALLO et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

O gene *malX*, marcador da ilha de patogenicidade da cepa arquetípica CTF073 (O6:K2:H1), é associado, tanto no homem quanto em animais de companhia, a infecções do trato urinário, pielonefrites, bacteremia e meningites neonatais (JOHNSON *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2003). O maior número de cepas contendo o gene *malX* foi observado no grupo Outro, o que sugere a possível transmissão dessas cepas de humanos e animais domésticos para os micos.

As fímbrias ou adesinas são essenciais no processo de infecção, pois possibilitam a adesão e colonização das células do hospedeiro (LE BOUGUENEC *et al.*, 1992). Os genes que codificam as adesinas S (*sfa*) ou fímbrias do tipo P (*papC* e *papEF*) são importantes indicadores de patogenicidade e têm sido associados com isolados capazes de ocasionar urosepse em animais de companhia e humanos (MAYNARD *et al.*, 2004).

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas segundo grupos filogenéticos, em cepas comensais, que pertencem em sua maioria, aos grupos filogenéticos A e B1, enquanto as patogênicas concentram-se principalmente em B2 e D (SMITH *et al.*, 2007). Neste trabalho, observou-se predomínio de cepas pertencentes ao grupo A (38,3%), principalmente em isolados de animais do grupo Urbano (50,4%), seguido pelo grupo filogenético B2 (24,4%).

Cepas de ExPEC humana normalmente se concentram, majoritariamente, nos grupos B2 e D, entretanto isso não foi observado em cepas de APEC (*E. coli* patogênica de aves). Além disso, constatou-se que ExPEC que se encontram nos grupos A e B1 possuem menor número de genes de virulência (LEMAÎTRE *et al.*, 2013). Entretanto, foi observado neste trabalho que algumas cepas de *E. coli* pertencentes aos grupos A e B1 possuíam três ou mais genes de virulência de ExPEC, sendo um deles o gene *malX*. Sabe-se que os genes de ExPEC podem ser transferidos horizontalmente por ilhas de patogenicidade ou plasmídeos (LEMAÎTRE *et al.*, 2013), aventando-se a possibilidade de que o gene *malX* possa transferir outros genes de ExPEC para as cepas comensais, como aquelas que compunham a microbiota dos micos.

A presença de bactérias resistentes em animais que não foram diretamente expostos a antimicrobianos pode refletir o grau de contaminação ambiental (COSTA *et al.*, 2013). O maior percentual de cepas resistentes ocorreu frente aos beta-lactâmicos, em especial às aminopenicilinas. Essas drogas são amplamente utilizadas no tratamento de doenças, tanto humanas quanto de animais de

companhia e produção (GUENTHER *et al.*, 2010), sendo os princípios ativos eliminados praticamente intactos no ambiente, o que pode levar à contaminação ambiental e disseminação da resistência (SAYAH *et al.*, 2005; NEGREANU *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013). É interessante ressaltar que o encontro de elevado índice de resistência aos beta-lactâmicos em cepas isoladas de animais do grupo Sítio (sem contato direto com homens e animais domésticos), é indicativo de que o fenômeno de resistência, uma vez surgido, não se limita aos nichos aos quais teve origem (COSTA *et al.*, 2013).

Tetraciclina, sulfonamida e estreptomicina são antimicrobianos utilizados em criações animais, principalmente de suínos (COLELLO *et al.*, 2015). Conquanto tenha sido baixa a resistência a essas drogas das cepas isoladas neste projeto, esses princípios ativos podem ser eliminados no ambiente e também se disseminam através da cadeia alimentar (COLELLO *et al.*, 2015). A presença de multirresistência encontrada nas cepas desta pesquisa, principalmente nas que foram isoladas do grupo Urbano, no qual os animais tinham relativo contato com humanos/outros animais, pode ser advinda de plasmídeos que carregam tanto resistência aos beta-lactâmicos, como à tetraciclina, aminoglicosídeos e sulfonamida (GULLBERG *et al.*, 2014), associada à disseminação da contaminação ambiental por ação antropogênica (GUENTHER *et al.*, 2011).

Vale salientar que cinco dos animais (35,7%) que albergavam cepas multirresistentes pertenciam ao mesmo agrupamento familiar (agrupamento 38), demonstrando claramente a troca de microbiota entre os membros de uma mesma família e a possível dispersão dessas bactérias no meio ambiente no qual eles vivem.

2.5 Conclusões

Analisando-se os resultados obtidos, constata-se que a ação humana parece intensificar a contaminação ambiental com cepas com potencial patogênico e/ou resistentes aos antimicrobianos. Alerta-se que o encontro dessas cepas não se limita apenas às áreas com maior impacto antropogênico, estando disseminadas mesmo em locais sem ação direta do homem.

Reforça-se a necessidade de estudos sanitários durante programas de translocação/relocação de animais selvagens, previamente à sua soltura, para a

manutenção de sanidade individual e do próprio ambiente no qual ocorrerá a liberação.

A avaliação de genes de virulência, classificação filogenética dos isolados de *E. coli* e resistência aos antimicrobianos podem ser indicativos da ação humana em um determinado ambiente. O estudo da microbiota dos animais selvagens de vida livre pode servir como bioindicador da Saúde Ambiental como um todo.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 251-259, 2010.
- BARDIAU, M.; GRÉGORIE, F.; MUYLEAERT, A.; NAHAYO, A.; DUPREZ, J. N.; MAINIL, J.; LINDEN, A. Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, p. 2214-2222, 2010.
- BÉLANGER, L.; GARENAUS, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extra intestinal pathogenic *E. coli*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 1-10, 2011.
- BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E. D.; JOHNSTON, M. D.; BARTON, H. A.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, p. 1-11, 2012.
- BLAAK, H.; VAN HOEK, A. H.; VEENMAN, C.; DOCTERS VAN LEEUWEN, A. E.; LYNCH, G.; VAN OVERBEEK, W. M.; DE RODA HUSMAN, A. M. Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 168-169, p. 8-16, 2014.
- CARRASCO, S. E.; BUREK, K. A.; BECKMEN, K. B.; OAKS, J. L.; DAVIS, M. A.; BAKER, K. N.; MAZET, J. A. Aerobic oral and rectal bacteria of free-ranging stellar sea-lion pups and juveniles (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 807-820, 2011.
- CARVALHO V. M. Colibacilose e salmonelose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, p. 742-750.
- CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1225-1234, 2003.
- CARVALHO, V. M.; OSUGUI, L.; SETZER, A. P.; LOPEZ, R. P.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; IRINO, K.; CATÃO-DIAS, J. L. Characterization of extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from captive wild felids with bacteremia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 24, p. 1014-1016, 2012.
- CARVALLO, F. R.; DEBROY, C.; BAEZA, E. Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 22, p. 136-40, 2010.

CLERMONT, Q.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - forth edition. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2013a.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard – eighteenth international supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2013b.

COLELLO, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; DI CONZA, J. A.; GUTKIND, G. O.; PADOLA, N. L. Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1-5, 2015.

COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 278-294, 2013.

DIARD., M.; GARRY, L.; SELVA, M.; MOSSER, T.; DENAMUR, E.; MATIC, I. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 4885-4893, 2010.

DIERIKX, C.; ESSEN-ZANDBERGEN, A. V.; VELDMAN, K.; SMITH, H.; MEVIUS, D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Vet. Microbiol.**, v. 145, p. 273-278, 2010.

GANNON, V. P.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E. J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 1268-1274, 1993.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

GRIEKSPoor, P.; COLLES, F. M.; MCCARHTY, N. D.; HANSBRO, P. M.; ASHHURST-SMITH, C.; OLSEN, B.; HASSELQUIST, D.; MAIDEN, M. C.; WALDENSTRÖM, J. Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. **Mol. Ecol.**, v. 22, p. 1463-1472, 2013.

GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L. H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Front. Microbiol.**, v. 2, p. 1-13, 2011.

GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; HEIDEMANN, K.; SCHLEGEL, M.; ULRICH, R. G.; EWERS, C.; WIELER, L. H. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. **Sci. Total Environ.**, v. 408, p. 3519-3522, 2010.

GULLBERG, E.; ALBRECHT, L. M.; KARLSSON, C.; SANDEGREN, L.; ANDERSSON, D. I. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. **MBio.**, v. 5, p. 1-9, 2014.

HABEEB, M. A.; SARWAR, Y.; ALI, A.; SALMAN, M.; HAQUE, A. Rapid emergence of ESBL producers in *E. coli* causing urinary and wound infections in Pakistan. **Pak. J. Med. Sci.**, v. 29, p. 540-544, 2013.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

IOVINE, R. O.; DEJUSTE, C.; MIRANDA, R.; FILONI, C.; BUENO, M. G.; CARVALHO, V. M. Isolation of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from free-ranging wild animals. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1257-1263, 2015.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 5703-5710, 2007.

IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. [Internet]. The Red List of Threatened Species. Version 2012.2. 2016. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 26 de fevereiro de 2016..

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J. R.; KASTER, N.; KUSKOWSKI, M. A.; LING, G. V. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 337-345, 2003.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI, M.; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 897-906, 2001.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KONEMAN, E.; ALLEN, D.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott, 1997. 1565 p.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LEMAÎTRE, C.; MAHJOUR-MESSAI, F.; DUPONT, D.; CARO, V.; DIANCOURT, L., BINGEN, E.; BIDE, P.; BONACORSI, S. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLOS One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

LIVERMORE, D. M.; ANDREWS, J. M.; HAWKEY, P. M.; HO, P.; KENESS, Y.; DOI, Y.; PATERSON, D.; WOODFORD, N. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 1569-1577, 2012.

MANSFIELD, K. G.; LIN, K. C.; XIA, D.; NEWMAN, J. V.; SCHAUER, D. B.; MACKEY, J.; LACKNER, A. A.; CARVILLE, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* and ulcerative colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 803-807, 2001.

MAYNARD, C., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIÈRE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5444-5452, 2004.

MILLER, K. A.; BELL, T. P.; GERMANO, J. M. Understanding publication bias in reintroduction biology by assessing translocations of New Zealand's herpetofauna. **Conserv. Biol.**, doi: 10.1111/cobi.12254, 2014.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa MMA nº 3, 27 de maio de 2003. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. 2003. Acesso em 26 de fevereiro de 2016. Disponível em: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/download/NovaListaFaunaAmeacaMMA2003.pdf>>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2016.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; THOMSON-CARTER, F.; USERA, M. A.; BARTOLOMÉ, R.; PRATS, G.; BLANCO, J. Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4007-4015, 2004.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; CASTRO, A. F. P. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-7408, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.142-201, 1998.

NDUNG'U, F. K., NDEGWA, M. W., DEMAAR, J. W. Patent urachus with subsequent joint infection in a free-living Grevy's zebra foal. **J. Wildl. Dis.**, v. 39, p. 244-245, 2003.

NEGREANU, Y., PASTERNAK, Z., JURKEVITCH, E., CYTRUN, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 4800-4808, 2012.

OBWEGESER, T.; STEPHAN, R.; HOFFER, E.; ZWEIFER, C. Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 149-154, 2012.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OH, J. Y.; KANG, M. S.; HWANG, H. T. Epidemiological investigation of eaeA-positive *Escherichia coli* and *Escherichia alberti* strains isolated from healthy wild birds. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 747-752, 2011.

OLSVIK, O.; RIMSTAD, E.; HORNES, E.; STROCKBINE, N.; WASTESON, Y.; LUND, A.; WACHSMUTH, K. A nested PCR followed by magnetic separation of amplified fragments for detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes. **Mol. Cell. Probes**, v. 5, p. 429-435, 1991.

ORÓS, J.; CALABUIG, P.; DÉNIZ, S. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. **Vet. Rec.**, v. 155, p. 169-174, 2004.

OSUGUI, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; IOVINE, R.; IRINO, K.; CARVALHO, V. M. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. **Vet. Microbiol.**, doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.027, 2014.

POLLARD, D. R.; JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZEE, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 540-545, 1990.

RABINOWITZ, P.; SCOTCH, M.; CONTI, L. Human and animal sentinels for shared health risks. **Vet. Ital.**, v. 45, p. 23-24, 2009.

RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M. A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. L.; DJORDJEVIC, S. P. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RUBTSOVA, M. Y.; ULYASHOVA, M. M.; BACHMANN, T. T.; SCHMID, R. D.; EGOROV, A. M. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, p. 1628-1649, 2010.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

RWEGO, I. B.; ISABIRYE-BASUTA, G.; GILLESPIE, T. R.; GOLDBERG, T. L. Gastrintestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. **Conserv. Biol.**, v. 22, p. 1600-1607, 2008.

RYLANDS, A. B.; MALLINSON, J. J. C.; KLEIMAN, D. G.; COIMBRA-FILHO A. F.; MITTERMEIER, R. A.; CÂMARA, I. G.; VALLADARES-PÁDUA, C.; BAMPI, M. I. A history of lion tamarin conservation and research. In: KLEIMAN, D.G.; RYLANDS, A.B. (eds), **Lion tamarins: biology and conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2002. p. 3-41.

RYLANDS, A. B. & MITTERMEIER, R. A.. The diversity of the New World Primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy, p. 23-54. In: GARBER, P. A., ESTRADA, A., BICCA-MARQUES, J. C., HEYMANN, E. W., STRIER, K. B. (ed.), **South American Primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation. Series Developments in Primatology: Progress and Prospects**. Springer Press, New York, 2009

SÁNCHEZ, S., MARTÍNEZ, R., REY, J., GARCÍA, A., BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J. E.; MORA, A.; HERRERA-LEÓN, S.; ECHEITA, A.; ALONSO J. M. Pheno-genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. **Vet. Microbiol.**, v. 142, p. 445-449, 2010.

SAVIOLI, J. Y.; CARVALHO, V. M.; GUERRA, M. F. L.; IRINO, K.; OSUGUI, L.; CATÃO-DIAS, J. L. Insight to virulence associated genes of *Escherichia coli* in frigates (*Fregata magnificens*) from São Paulo coast, Brazil. In: **International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals**, 2010, Madri. Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals. Berlin: Leibniz Institute of Zoo and Wildlife Research, 2010. p. 264-267.

SAYAH, R. S.; KANEENE, J. B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic – and wild – animal fecal samples, human septage and surface water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 1394-1404, 2005.

SCHIERACH, P.; WALK, N.; EWERS, C.; WILKING, H.; STEINRÜCK, H.; FILTER, M.; WIELER, L. H. ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* a small piglet group. **Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 1742-1751, 2008.

SCHULTSZ, C.; GEERLINGS, S. Plasmids-mediated resistance in Enterobacteriaceae, **Drugs**, v. 72, p. 1-16, 2012.

SCHWARTZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; HOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SCIMECA, J. M.; BRADY, A. G. Neonatal mortality in a captive breeding squirrel monkey colony associated with an invasive *Escherichia coli*. **Lab. Anim. Sci.**, v. 40, p. 546-547, 1990.

SHAM, H. P.; SHAMES, S. R.; CROXEN, M. A.; MA, C.; CHAN, J. M.; KHAN, M. A.; WICKHAM, M. E.; DENG, W.; FINLAY, B. B.; VALLANCE, B. A. Attaching and effacing bacterial effector NleC suppresses epithelial inflammatory responses by inhibiting NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase activation. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 3552-3362, 2011.

SILVA, G. J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, p. 18-28, 2012.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.4, p.134-163, 2007.

STEIN, C.; MAKAREWICZ, O.; PFEIFER, Y.; BRANDT, C.; RAMOS, J. C.; KLINGER, M.; PLETZ, M. W. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M- type extended-spectrum β -lactamases (ESBL). **PloS One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

STUMPF, R. M.; GOMEZ, A.; AMATO, K. R.; YEOMAN, C. J.; POLK, J. D.; WILSON, B. A.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A.; LEIGH, S. R. Microbiomes, metagenomics, and primate conservation: new strategies, tools, and applications. **Biol. Conserv.**, v. 199, p. 56-66, 2016.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TRANG, N. H. T.; NGA, T. V. T.; CAMPBELL, J. I.; HIEP, N. T.; FARRAR, J.; BAKER, S.; DUY, P. T. The characterization of ESBL genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infections in Vietnam. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 7, p. 922-928, 2013.

VERONA, C. E. S.; PISSINATII, A. 2007. Primates – Primatas do novo mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (eds.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo: Roca, 2007. p. 358-377.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R. T. S.; FRANKERL, G.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

WEINHOLD. Conservation medicine: combining the best of all worlds [Editorial]. **Environ. Health Perspect.**, v.111, p. 524-59, 2003.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 3687-3694, 2003.

XU, Y.; BAI, X.; ZHAO, A.; ZHANG, W.; BA, P.; LIU, K.; JIN, Y.; WANG, H.; GUO, Q.; SUN, H.; XU, J.; XIONG, Y. Genetic diversity of intimin gene of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from human, animals and raw meats in China. **PLOS One**, doi:10.1371/journal.pone.0152571, 2016.

ANEXOS

CERTIFICADO UNIP



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 140/12 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado: "Caracterização de enterobactérias potencialmente zoonóticas em micos-leões-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) de vida livre durante projeto de translocação", "Espécie utilizada: Mico-leão-da-cara-dourada " "Número de animais utilizados: 330 " sob a responsabilidade de " SELENE DALL' ACQUA COUTINHO e RENATA DE OLIVEIRA IOVINE' " , está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 28 dias do mês de novembro de 2012.

A handwritten signature in black ink, reading "Juliana Guizi".

Juliana Guizi
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP

CERTIFICADO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30939-4	Data da Emissão: 18/05/2012 17:16
Dados do titular	
Nome: Maria Cecília Martins Kierulff	CPF: 692.548.346-53
Título do Projeto: Projeto de remoção do mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>) invasor na área de ocorrência do mico-leão-dourado (<i>Leontopithecus rosalia</i>).	
Nome da Instituição: Inst Pri-Matas p/a a Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 09.323.873/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura no Rio de Janeiro	12/2011	09/2013
2	Monitoramento	09/2012	09/2014
3	Monitoramento na Bahia	04/2012	04/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	gabriel jose rodrigues dos santos	Colaborador	003.148.058-89	7557821-9 SSP/SP-SP	Brasileira
2	ALCIDES PISSINATTI	Veterinário	208.501.317-15	959916 IPF-RJ	Brasileira
3	Paula Procópio de Oliveira	Subcoordenadora	688.699.756-49	MG2295537 SSP-MG	Brasileira
4	Daniel Eduardo da Luz	Biólogo	054.624.887-00	093496297 IPF-RJ	Brasileira
5	Marina Galvão Bueno	Veterinária	251.174.338-82	23678020-x ssp/sp-SP	Brasileira
6	Rodrigo Costa Araújo	Biólogo	000.317.100-00	9069883743 SJS-RS	Brasileira
7	Jose Luiz Caño Dias	veterinário	029.597.888-00	8914397-8 SSP-SP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 48727429



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30939-4	Data da Emissão: 18/05/2012 17:16
Dados do titular	
Nome: Maria Cecília Martins Kierulff	CPF: 692.548.346-53
Título do Projeto: Projeto de remoção do mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>) invasor na área de ocorrência do mico-leão-dourado (<i>Leontopithecus rosalia</i>).	
Nome da Instituição: Inst Pri-Matas p/a a Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 09.323.673/0001-00

1	NITEROI	RJ	Parque Estadual Serra da Tiririca	Fora de UC Federal
2	MARICA	RJ	Parque Estadual Serra da Tiririca	Fora de UC Federal
3	NITEROI	RJ	Reserva Ecológica Darcy Ribeiro	Fora de UC Federal
4	BELMONTE	BA	Fazenda Taquara	Fora de UC Federal
5	PORTO SEGURO	BA	Porto Seguro	Fora de UC Federal
6	ITAPEBI	BA	Itapebi	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Calithrix, Leontopithecus
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Calithrix, Leontopithecus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leontopithecus (*Qtde: 200), Calithrix (*Qtde: 200)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Leontopithecus, Calithrix
5	Marcação de animais silvestres in situ	Leontopithecus

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Animal encontrado morto ou partes (carcassa/ossos/pele, Fezes, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Primatas)	Rádio transmissor externo, Tatuagem, Tatuagem (tinta)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	INSTITUTO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE - INEA	criadouro científico
2	Universidade Paulista UNIP	
3	Instituto de Biomedicina (ICB), Depart de Parasitologia	
4	UNIFESP	
5	ICB / USP Depart. de Imunologia	
6	Instituto de Medicina Tropical IMT/USP	
7	Instituto Pasteur	
8	FMVZ/USP/ Depart. de Med. Preventiva e Saúde Animal	
9	Lab. de Patologia das Doenças Infecciosas FMUSP-LIM50	
10	Instituto de Medicina Tropical (IMT)	
11	Instituto Biológico, Centro de Pesq. Saúde Animal	
12	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	
13	UFF / Faculdade de Veterinária	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 48727429



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 30939-4	Data da Emissão: 18/05/2012 17:16
Dados do titular	
Nome: Maria Cecília Martins Kierulff	CPF: 692.548.346-53
Título do Projeto: Projeto de remoção do mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>) invasor na área de ocorrência do mico-leão-dourado (<i>Leontopithecus rosalia</i>).	
Nome da Instituição: Inst Pri-Matas p/a a Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 09.323.873/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 48727429



Página 3/3