

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

INDIARA DOS SANTOS SALES

AVALIAÇÃO DA SANIDADE E DA MICROBIOTA DE HÍBRIDOS DE SAGUIS
(*Callithrix sp.*) E MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*) DE VIDA LIVRE
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Campos dos Goytacazes

2015

INDIARA DOS SANTOS SALES

AVALIAÇÃO DA SANIDADE E DA MICROBIOTA DE HÍBRIDOS DE SAGUIS
(*Callithrix sp.*) E MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*) DE VIDA LIVRE
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como requisito
parcial para a obtenção do grau de doutor
em Ciência Animal na Área de
Concentração de Doenças
Infectocontagiosas.

ORIENTADOR: Prof. Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes

2015

Á minha querida avó Juracira Calisto Alves (*in memoriam*)

A todos os irmãos animais

A todos que amam e respeitam os animais.

AGRADECIMENTOS

Em todas as vitórias na minha vida agradecerei sempre em primeiro lugar ao Criador e ao irmão, Jesus Cristo, pela força, inspiração e por não deixarem que as minhas dificuldades impeçam o meu progresso;

Ao meu companheiro de caminhada conhecido como “anjo da guarda”, pelas boas intuições;

Ao professor orientador deste trabalho, Olney Vieira da Motta por ter me dado esta oportunidade e por ter acreditado em mim;

Ao professor Carlos Ramon Ruiz-Miranda pelo auxílio fundamental para a realização deste trabalho;

A equipe de captura da Associação Mico Leão Dourado: Andréia Martins, Ademilson de Oliveira, Synval de Melo, Jadir Ramos, Oberlan Júnior e Elisamã dos Santos pelo carinho e pela fundamental ajuda no campo. Obrigada amigos!

As técnicas do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UENF, Gina Nunes e Lourdes Bernardino pela paciência que tiveram comigo e pelos valiosos ensinamentos. Obrigada minhas professoras!

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Nova de Lisboa, Portugal, Isilda Gueifão, Teresa Conceição, Nuno Faria, Catarina Milheiriço, Teresa Figueiredo, Ons Bouchami, Inês Grilo e Débora Tavares pela atenção; A Céline Coelho pela companhia e ajuda dentro e fora do laboratório; A Ana Tavares e Maria Miragaia, que gentilmente compartilharam comigo os seus conhecimentos práticos e teóricos de genética molecular com paciência, dedicação e compreensão da minha condição de aprendiz;

A professora Herminia de Lencastre por ter me aceitado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Nova de Lisboa, Portugal;

Aos colegas de Laboratório Sueli Marins, Marina Blume, João Gatto, Maria Luiza Serafim, Iago Rocha, Solange Amaral, Elisabete Sales, Luize Garcia, Fernanda Eni, Luciana Mathias, Leonardo Willian e Maria Fabíola Rangel pela ajuda e pelos momentos de descontração na bancada;

A minha querida mãe, Jubiara Leal a qual amo e tenho muito orgulho, e que mesmo distante sempre se preocupou comigo e me incentivou com suas palavras e preces;

As queridas amigas Vanessa Trindade, Ludmila Haddad e Aline Tassari por todos os momentos que passamos juntas e por ouvirem minhas lamentações e reclamações;

A equipe da ASTRAN/UENF em especial a Fernanda e a Hedwiges pela ajuda e paciência;

A equipe do Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, em especial a professora Dália dos Prazeres Rodrigues e a Renata Garcia por compartilharem seus conhecimentos comigo;

A equipe do Setor de Campylobacter do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO) da FIOCRUZ pela preciosa colaboração;

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduiche no Exterior;

As minhas “cãopanheiras” Baixota Sales e Belota Sales pelo amor incondicional e por me receberem em casa sempre com alegria e amor ao final de cada dia de trabalho.

“Enquanto o homem continuar a ser o destruidor dos seres animados dos planos inferiores, não conhecerá a saúde nem a paz. Enquanto os homens massacrarem os animais, eles se matarão uns aos outros. Aquele que semeia a morte e o sofrimento não pode colher a alegria e o amor”.

(Pitágoras de Samos, filósofo grego).

RESUMO

Nas regiões sudeste e sul do Brasil, as espécies de primata *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* (“saguis”) são consideradas invasoras, representando uma ameaça à sobrevivência *in situ* de espécies nativas como o *Leontopithecus rosalia* (“mico-leão-dourado”). Não existem informações se os saguis presentes na área de ocorrência do *L. rosalia* albergam bactérias com potencial patogênico para a espécie nativa. Foi investigada a ocorrência e a sensibilidade aos antibióticos de bactérias Gram-negativas (BGN) e de estafilococos que colonizam híbridos de saguis e micos-leões-dourados que ocorrem em área de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro. 33 espécies de BGN de 17 gêneros foram isoladas de suabes orais e retais de 50 saguis e 101 micos-leões-dourados sendo que 4 espécies, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Campylobacter jejuni* são potencialmente patogênicas para o *L. rosalia*. A cefalotina e o sulfametoxazol/trimetropim foram os antimicrobianos que apresentaram menor potencial inibidor para *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Com relação aos estafilococos, cinco espécies foram identificadas: *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri*, *S. simiae*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus*. Os *S. aureus* foram sensíveis a todos os antibióticos testados, porém os CoNS mostraram alta frequência de resistência a oxacilina, ácido fusídico e penicilina. 5 spa types e 5 STs foram identificados sendo os clones *S. aureus* ST6-t701 e ST188-t189 os mais comuns. 97% dos isolados de *S. aureus* carregavam genes das leucocidinas LukE-LukD e das hemolisinas gamma variante e beta e 12,2% da leucocidina PVL. Micos-leões-dourados e híbridos de saguis em vida livre albergam uma ampla variedade de BGN e de estafilococos, incluindo espécies potencialmente patogênicas, porém não foram encontradas diferenças significativas na ocorrência dessas bactérias em grupos de micos-leões que habitam áreas com a presença dos invasores quando comparado com os grupos de micos-leões que habitam áreas sem a presença dos invasores.

Palavras-chave: *Callithrix* sp., *Leontopithecus rosalia*, invasão biológica, *Staphylococcus*, PCR, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

In the South and Southeast regions of Brazil, the species of primate *Callithrix jacchus* and *C. penicillata* ("marmosets") are considered invasive, posing a threat to the survival of native species *in situ* as the *Leontopithecus rosalia* ("golden lion tamarin"). No information is marmosets present in the area of occurrence of *L. rosalia* harbor bacteria with pathogenic potential for native species. The occurrence and the antibiotic susceptibility of Gram-negative bacteria (GNB) and staphylococci colonizing hybrid of marmosets and tamarins occurring in Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro was investigated. GNB 33 species of 17 genera were isolated from oral and rectal swabs of 50 marmosets and 101 golden lion tamarins. Four species, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Campylobacter jejuni* are potentially pathogenic for *L. rosalia*. Cefalotin and trimethoprim / sulfamethoxazole were the antimicrobials that had lower potential inhibitor for *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively. With respect to staphylococci, five species were identified: *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri*, *S. simiae*, *S. xylosus* and *S. saprophyticus*. The *S. aureus* were sensitive to all antibiotics tested, but the CoNS showed a high level of resistance to oxacillin, penicillin and fusidic acid. 5 spa types and 5 STs were identified clones, being *S. aureus* ST6 T701-T189-ST188 and the most common. 97% of *S. aureus* isolates carried genes of luke-LukD leucocidinas and hemolysin gamma and beta variant and 12.2% of Leucocidin PVL. Lion tamarins and marmosets golden hybrids in the wild to a wide variety of BGN and staphylococci, including potentially pathogenic species, but there were no significant differences in the occurrence of these bacteria in groups of tamarins living in areas with the presence of invaders when compared to the tamarins groups living in areas without the presence of the invaders.

Keywords: *Callithrix* sp., *Leontopithecus rosalia*, biological invasion, *Staphylococcus*, PCR, antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
	CAPÍTULO 1	
	OCORRÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE FENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE HÍBRIDOS DE SAGUIS (<i>Callithrix</i> spp.) E DE MICOS-LEÕES-DOURADOS (<i>Leontopithecus rosalia</i>) DE VIDA LIVRE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS PATOGÊNICAS PARA PNH.....	17
2.2	RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE PNH.....	25
3	OBJETIVOS	28
4	JUSTIFICATIVAS	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	QUESTÕES ÉTICAS.....	30
5.2	ÁREAS DE ESTUDO.....	30
5.3	CAPTURE DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	30
5.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	33
5.5	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
5.6	ANÁLISES ESTÁTICAS.....	37
6	RESULTADOS	38
6.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS.....	38
6.2	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS.....	39
6.3	SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	41
6.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
7	DISCUSSÃO	45

8	CONCLUSÃO.....	50
9	REFERENCIAS.....	51
CAPÍTULO 2		
AVALIAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COLETADOS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DE VIDA LIVRE (<i>Callithrix</i> spp. E <i>Leontopithecus rosalia</i>) COMO RESERVATÓRIOS DE GENES DE VIRULÊNCIA E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....		
		61
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	62
2.1	ESTAFILOCOCOS EM PNH.....	62
2.2	RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS EM ESTAFILOCOCOS DE PNH..	65
3	OBJETIVOS.....	67
4	JUSTIFICATIVAS	68
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS.....	69
5.2	TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	70
5.3	ENSAIOS MOLECULARES.....	71
5.3.1	Extração do DNA cromossomal.....	71
5.3.2	Identificação molecular das espécies de estafilococos.....	72
5.3.3	Tipagem do gene de Proteína A de <i>S. aureus</i> (<i>spa</i>).....	73
5.3.4	Detecção dos genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i>	74
5.3.5	Amplificação e sequenciamento da região do promotor do gene <i>mecA-1</i>	74
5.3.6	Detecção do gene <i>blaZ</i>	75
5.3.7	Detecção dos genes <i>fusB</i> e <i>fusC</i>	75
5.6.8	Detecção de genes de fatores de virulência.....	75
5.6.9	Gel de Eletroforese em Campo Pulsável (PFGE).....	78
5.6.10	Multilocus Sequence Typing (MLST) dos isolados de <i>S. aureus</i>	81

5.6.11	Southern blotting para o <i>mecA</i> e <i>blaZ</i>	81
6.	RESULTADOS	82
6.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS.....	82
6.2	ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS ISOLADAS E OCORRÊNCIA.....	82
6.3	SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	83
6.4	ANÁLISES MOLECULARES.....	85
7.	DISCUSSÃO	94
8.	CONCLUSÃO	98
9.	REFERENCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

No estado do Rio de Janeiro ocorrem seis espécies de primatas não humanos (PNH), sendo que duas espécies, *Callicebus nigrifrons* (“sauá”) e *Callithrix aurita* (“sagüi-da-serra”) encontram-se vulneráveis a extinção e outras duas, *Brachyteles arachnoides* (“muriqui-do-sul”) e *Leontopithecus rosalia* (“mico-leão-dourado”) estão ameaçadas de extinção (IUCN, 2014).

O *L. rosalia* ocorre restritamente em área de Mata Atlântica de baixada da região costeira do estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A coloração da pelagem é totalmente dourada e a face nua é cercada por uma juba de pelos, de onde provém o seu nome popular. O peso varia entre 410 a 700 Gramas e a dieta inclui frutos, flores, néctar, insetos e pequenos vertebrados. A área de vida varia de 21 a 150 ha e os grupos são formados por 2 a 14 indivíduos. São animais de hábito diurno e à noite dormem em ocos de árvores ou emaranhados de cipós e bromélias. A gestação dura cerca de 120 dias (BICCA-MARQUES *et al.*, 2006) e o sistema de acasalamento é geralmente monogâmico, onde a fêmea-alfa inibe a ovulação das demais fêmeas do grupo através de feromônios e comportamentos agonísticos e cerca de 90% dos partos são de gêmeos (RUIZ-MIRANDA *et al.*, 2008).

O histórico processo de desmatamento da Mata Atlântica associado à caça predatória para suprir o comércio da espécie, levou a um drástico declínio das populações naturais de mico-leão-dourado, o que fez com que a espécie fosse classificada como criticamente ameaçada de extinção pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) em 1996. Graças ao trabalho de pesquisadores, a categoria da espécie foi mudada para ameaçada de extinção (RYLANDS *et al.*, 2008).

Atualmente, o mico-leão-dourado habita regiões fragmentadas de Mata Atlântica, com predominância de fragmentos com menos de 50 ha, localizados nos municípios de Silva Jardim, Rio Bonito, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras, Cabo Frio, Armação dos Búzios e Saquarema. Grande parte dessas populações ainda é vulnerável a eventos que levam a extinção, dentre esses, a introdução de espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2008; RUIZ-MIRANDA *et al.*, 2008). A introdução de espécies ocorre quando indivíduos são deslocados, seja de forma acidental ou planejada, dos seus habitats nativos para um novo ambiente (BRUNO & BARD, 2012).

O *Callithrix jacchus* (“sagui-de-tufo-branco”) e o *C. penicillata* (“sagui-de-tufo-preto”) foram introduzidos em remanescentes de Mata Atlântica da região sudeste e sul do Brasil apresentando um alto potencial de dispersão, reprodução e hibridação, a partir do cruzamento dessas espécies entre si ou com espécies nativas. Devido ao comércio ilegal e à grande facilidade de adaptação em ambientes degradados, populações dessas espécies ou de híbridos são encontradas atualmente fora da sua distribuição geográfica original, nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná, entre outros (RUIZ-MIRANDA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; MORAIS JR. *et al.*, 2008; BRUNO & BARD, 2012; TRAAD *et al.*, 2012).

Segundo Morais Jr. *et al.*, (2008), os saguis representam uma ameaça potencial a conservação *in situ* do mico-leão-dourado pois a ecologia e a biologia dessas espécies são parecidas, o que leva a competição por alimentos e refúgio, além do risco potencial da transmissão de patógenos.

O *C. jacchus* é endêmico da região nordeste do país incluindo os estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Rio Grande do Norte. Seu peso varia de 250 a 350 Gramas e o tamanho de 20 a 30 centímetros. Possui pelagem de coloração cinza-clara com áreas castanhas e pretas, tufo de pelo branco ao redor das orelhas, em forma de leque e, a cauda longa é listrada em preto e branco de forma intercalada. A dieta inclui frutos, insetos e goma das árvores. Os grupos, formados por 3 a 15 indivíduos, possuem hábitos diurnos e à noite se abrigam em emaranhados de cipós e ocos de árvores. O sistema de acasalamento é flexível com a ocorrência de poliginia, poliandria e monogamia. A maturidade sexual das fêmeas ocorre com 12 a 15 meses de idade e dos machos em torno de 12 meses, e a gestação varia de 143 a 150 dias. A área ocupada pelos grupos varia de 0,5 a 5 hectares (BICCA-MARQUES *et al.*, 2006; TRAAD *et al.*, 2012).

O *C. penicillata* é original de florestas e cerrado dos estados da Bahia, Goiás, São Paulo e Minas Gerais. Esses animais possuem tufo de pelos auriculares negros e longos, em forma de pincel. A coloração da pelagem do corpo é cinza-escura a negra e da cauda em tons branco e preto. O peso, a dieta e o comportamento são semelhantes ao do *C. jacchus*. Os grupos são formados por 4 a 13 indivíduos que ocupam uma área de 2 a 3 ha (BICCA-MARQUES *et al.*, 2006; TRAAD *et al.*, 2012).

Embora a grande maioria das espécies alóctones não se estabeleça no novo ambiente, algumas espécies conseguem se adaptar, reproduzindo e se mantendo em detrimento das espécies nativas, representando um fator determinante de

extinção destas, devido à ocorrência de eventos como competição por recursos, predação e perda de características genéticas (quando há cruzamento da espécie introduzida com espécie nativa) (RUIZ-MIRANDA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; BRUNO & BARD, 2012; TRAAD *et al.*, 2012).

Ademais, as espécies exóticas também representam um risco para a saúde das espécies nativas, pois possibilitam a inserção de novos agentes patogênicos e novos reservatórios para os agentes etiológicos de doenças preexistentes, o que pode ocasionar o aumento da incidência de enfermidades entre as espécies nativas (SMITH *et al.*, 2008; PETRŽELKOVÁ *et al.*, 2010), especialmente em ambientes fragmentados e populações pequenas (GILLESPIE & CHAPMAN, 2006; MORAIS JR. *et al.*, 2008). Os invasores também podem constituir importantes reservatórios de bactérias produtoras de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos que podem ser disseminadas para as espécies locais, incluindo o homem. Atualmente, o conhecimento sobre a ocorrência de animais que albergam agentes patogênicos e resistentes a antibióticos é considerado uma questão fundamental para a preservação de animais selvagens em vida livre (RADHOUANI *et al.*, 2014).

Algumas espécies do gênero estafilococos, por exemplo, ocorrem em seres humanos e PNH (KLOOS, 1980). Embora, pareça existir uma barreira espécie-hospedeiro para muitos microrganismos que impede a disseminação de bactérias entre animais e seres humanos, certos tipos de clones de microrganismos apresentam a capacidade de sobreviver em diferentes hospedeiros (KLOOS, 1980; HERRON-OLSON *et al.*, 2007; LOWDER *et al.*, 2009; VINCZE *et al.*, 2013). Contudo, a composição da microbiota de PNH de vida livre ainda é pouco conhecida (MENEZES-COSTA *et al.*, 2013) e são escassas as informações sobre PNH neotropicals de vida livre como reservatórios de bactérias portadoras de genes que codificam fatores de resistência e de virulência.

Portanto, a fim de contribuir para a compreensão do papel dos saguis como reservatórios de bactérias potencialmente patogênicas e resistentes a antimicrobianos, na área de ocorrência natural do mico-leão-dourado, foram analisadas no presente estudo a ocorrência e a susceptibilidade fenotípica aos antimicrobianos das bactérias Gram-negativas de importância médica e dos estafilococos isolados e foi realizada análise molecular nos estafilococos obtidos, que consistiu na identificação dos tipos clonais e na pesquisa de fatores de virulência e de resistência a antibióticos.

CAPÍTULO 1

**OCORRÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE FENOTÍPICA A
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS
DE HÍBRIDOS DE SAGUIS (*Callithrix* sp.) E DE MICOS-LEÕES-
DOURADOS (*Leontopithecus rosalia*) DE VIDA LIVRE NO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS PATOGÊNICAS PARA PNH

2.2.1 Família Enterobacteriaceae

Os membros da família Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase-negativos, catalase-positivos, anaeróbios facultativos, fermentam carboidratos com ou sem produção de gás e reduzem nitrato a nitrito. De uma maneira geral, crescem muito bem em meios líquidos básicos, meios sólidos ricos como o ágar sangue, além dos meios específicos como o ágar EMB e o MacConkey. Constitui a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância médica, cujo habitat natural é o trato intestinal. (ANVISA, 2004; TORTORA *et al.*, 2012).

As bactérias entéricas são divididas em 42 gêneros (TORTORA *et al.*, 2012), sendo que espécies de 5 gêneros, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia* e *Klebsiella* são de especial importância na clínica de PNH do velho e do novo mundo, por causarem preferencialmente infecções gastrintestinais embora, possam também causar infecção em outros locais (STEYN *et al.*, 1976; CUBAS, 1996; LUDLAGE & MANSFIELD, 2003; OKWORI *et al.*, 2013).

Cubas (1996) destaca que a imunossupressão causada pela exposição a fatores estressantes físicos e psicológicos faz parte da patogênese das diarreias bacterianas que acometem símios mantidos em cativeiro.

De um modo geral, PNH imunocompetentes que albergam bactérias enteropatogênicas apresentam-se assintomáticos ou desenvolvem infecções leves e autolimitantes, por outro lado, em animais imunossuprimidos pode ocorrer enterocolite aguda ou crônica e morte súbita. Em ambos os casos, haverá a excreção do patógeno no ambiente representando um risco para a saúde de humanos e outros animais que tenham contato com PNH infectados com essas bactérias (OKWORI *et al.*, 2013).

Nas décadas de 50, 60 e 70 diferentes autores já relatavam que, infecções por *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. estavam entre as principais causas de diarreia em PNH do gênero Macaca mantidos em cativeiro (HABERMAN & WILLIAMS, 1957;

SAUER & FEGLEY, 1960; SCHNEIDER *et al.*, 1960; GOOD *et al.*, 1969; PALUMBO & PERRI, 1972; ARYA *et al.*, 1973).

Os principais sinais clínicos da salmonelose e da shigelose em PNH são diarreia aquosa com sangue e muco, desidratação, febre, dores abdominais, anorexia, depressão e esforço ao defecar podendo culminar com a morte. A presença de coinfeção em PNH por essas duas bactérias pode ocorrer e a principal forma de transmissão é a contaminação fecal dos alimentos e a da água (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

Steyn *et al.* (1976) verificaram um drástico aumento na incidência de enterobactérias não patogênicas e patogênicas em estudo realizado com babuínos (*Papio ursinus*) recém-capturados na África. Dos 776 animais capturados 394 apresentaram diarreia a partir do quinto dia em cativeiro. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Klebsiella* spp. foram os enteropatógenos isolados. A imunossupressão causada pelo stress de cativeiro foi citada como a causa do aumento da incidência das enterobactérias e o aparecimento de doença entérica. Outros fatores, como a mudança da dieta, foi citada como possível causa do aparecimento das diarreias nos animais que não foram isoladas bactérias enteropatogênicas.

Análises *post mortem* revelaram que 34% das mortes de macacos rhesus (*M. mulatta* e *M. radiata*) mantidos no California Primate Research Center foram devido a doenças no trato gastrintestinal, sendo que 18% dessas foram shigelose (HOLMBERG *et al.*, 1982).

Um estudo foi realizado com macacos cinomolgo (*M. fascicularis*) recém-capturados com o intuito de verificar a microbiota intestinal bacteriana dos animais durante o período da quarentena. *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. foram isoladas respectivamente em 8,7% (55/632) e 2,7% (17/632) dos animais que apresentaram diarreia nos primeiros 30 dias de quarentena. Dos 1.670 animais que se apresentavam clinicamente normais nesse período, 0,8% albergava *Shigella* spp. e 0,2% *Salmonella* spp. Nesse estudo, os autores alertam para a importância do esforço no diagnóstico de enteropatógenos em PNH durante a quarentena já que, a eliminação de bactérias como a *Shigella* pode ocorrer de forma intermitente, inclusive em animais doentes. (TRIBE & FLEMING, 1983).

Estudo semelhante foi realizado por Loureiro *et al.* (1985) com 77 PNH neotropicais (*Cebus apella*, *Saimiri sciureus*, *Callithrix argentata* e *Aotus trivirgatus*)

capturados na região da Amazônia brasileira. Nas amostras coletadas antes de completar 30 dias de cativeiro não foram isoladas *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Em 19,4% (15/77) das amostras foi isolada *K. pneumoniae*. Após 6 meses de cativeiro foi isolado *Salmonella* Worthington em um símio e o mesmo se apresentava sem alterações clínicas.

Kindlovits e Kindlovits (2009) citam autores que destacam que espécies de PNH do novo mundo podem albergar *Salmonella* e *Shigella* sem apresentarem sinais clínicos de doença, sendo as espécies de PNH do velho mundo mais sensíveis à infecção por essas bactérias. Contudo, Cooper e Needham (1976) relatam um significativo surto de shigelose causado pela *S. sonnei* em *C. jacchus* e *Saguinus nigricollis* mantidos em cativeiro, e 30% dos animais vieram a óbito devido à infecção. Okwori *et al.* (2013) relatam uma ocorrência de 100% de *E. coli* e *Salmonella* Paratyphi em indivíduos de macaco mona (*Cercopithecus mona*), macaco verde (*Chlorocebus tantalus*), macaco pata (*Erythrocebus patas*), babuíno verde (*Papio anubis*) e chimpanzé (*P. troglodytes*) mantidos em um zoológico na Nigéria. Todos os animais apresentavam-se aparentemente saudáveis na ocasião do estudo. *Y. enterocolitica* também foi isolada em macacos pata e chimpanzés.

A shigelose foi apontada como a segunda principal causa de morte por infecção intestinal aguda em diferentes gêneros de PNH do velho mundo mantidos em um centro de pesquisas russo, o Adler Breeding Center, sendo a enterocolite e a gastroenterocolite os principais achados na necropsia e a *S. flexneri* a espécie mais frequente (ARDASHELIYA *et al.*, 2011).

Verona (2009) isolou *Salmonella* Enteritidis ou Newlands a partir de suabe da cavidade anal de saguis *C. jacchus* mantidos no Centro de Triagem do IBAMA, RJ, aparentemente saudáveis. Por outro lado, Knöbl *et al.*, (2011) descrevem um caso de salmonelose fatal em uma fêmea de *C. jacchus* causada por um sorotipo de *Salmonella* considerado exótico no Brasil, a *S. Yoruba*. O animal apresentou diarreia profusa e os exames *post-mortem* revelaram a presença de enterite com muco, hepatomegalia e necrose hepática.

Paixão *et al.* (2014) relatam um caso de colite hemorrágica por *Salmonella enterica* sorotipo Infantis em um gorila (*Gorilla gorilla gorilla*) que veio a óbito após 7 dias de tratamento em um zoológico no Brasil. Segundo os autores, doenças entéricas estão entre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade de gorilas mantidos em cativeiro sendo estas, causadas geralmente por bactérias.

Entre os anos de 1970 a 1980 foram registrados surtos de yersiniose (*Y. enterocolítica* e *Y. pseudotuberculosis*) em colônias de PNH do velho e do novo mundo (McCLURE *et al.*, 1971; BRONSON *et al.*, 1972; BAGGS *et al.*, 1976; BUHLES *et al.*, 1981). A infecção por *Yersinia* spp. pode ocasionar consideráveis taxas de mortalidade e, em vários casos, afeta um grande número de macacos nas colônias. Pequenos roedores e pássaros são considerados fontes de infecção para PNH através da contaminação da água e dos alimentos pelas fezes desses animais, considerados reservatórios assintomáticos (BUHLES *et al.*, 1981).

Os sinais clínicos da yersiniose relatados em PNH são febre, desidratação, diarreia muco sanguinolenta e aborto. A patogênese desta enfermidade está relacionada com a invasão do microrganismo na mucosa do íleo, ceco e cólon, chegando à circulação sistêmica e atingindo outros órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e mesentéricos, causando necrose e múltiplos abscessos nesses órgãos (BUHLES *et al.*, 1981).

Pissinatti *et al.* (2008) relatam que a yersiniose pode causar morte súbita em calitriquídeos. Os animais são frequentemente encontrados mortos apresentando lesões hepáticas e entéricas supurativas. A presença de estruturas massivas nos órgãos acometidos, que consistem em uma coleção de bactérias auxilia no diagnóstico diferencial desta doença nesses animais.

Buhles *et al.* (1981) também relataram a presença de endometrite erosiva com áreas focais de necrose, hemorragia e miometrite no útero de fêmeas de macaco de cheiro (*Saimiri sciureus*) que vieram a óbito devido à infecção por *Y. pseudotuberculosis*. Nesta investigação, análises sorológicas realizadas revelaram que 37% dos animais que não demonstraram sinais clínicos de doença apresentavam altos títulos de anticorpos para *Y. pseudotuberculosis*.

A pseudotuberculose foi responsável por significativas perdas de animais em colônias de saguis (*Callithrix* spp. *Saguinus* spp e *Callimico* spp) mantidos no Jersey Zoo, Reino Unido. De acordo com os autores as mortes obedeceram a um padrão sazonal, ocorrendo durante períodos secos e frios do ano (BIELLI *et al.*, 1999). Yersiniose generalizada também foi responsável pela morte de *M. fascicularis* e *Papio hamadryas* mantidos em cativeiro. Na necropsia foram encontradas lesões típicas da doença no trato gastrintestinal e, em diversos órgãos, *Y. pseudotuberculosis* foi isolada de amostras do fígado, baço, rim, linfonodos mesentéricos, pulmão e estômago (ARDASHELIYA *et al.*, 2011).

Fredriksson-Ahomaa *et al.* (2007) relatam 2 casos fatais de infecção por *Y. enterocolitica* sorotipo 4/O:3 que ocasionou necrose miliar disseminada no fígado em *C. jacchus* nascidos no Zagreb Zoo, Croácia. Soto *et al.* (2013), descrevem que 46 macacos verdes africanos (*Chlorocebus aethiops sabaenus*) mantidos em um centro de pesquisas no Caribe vieram a óbito devido a um surto de doença entérica aguda causada por *Y. enterocolitica*.

A infecção por patotipo de *E. coli* enteropatogênica causou colite ulcerativa aguda em uma colônia de micos imperadores (*Saguinus oedipus*) mantida no New England Regional Primate Research Center. Os sintomas e sinais incluíam diarreia profusa e, eventualmente, hemorrágica, anorexia, desidratação, leucocitose neutrofílica, acidose metabólica e hipocalcemia. Os pesquisadores também constataram que, após sete meses do diagnóstico inicial, a infecção persistiu mesmo com a ausência dos sinais clínicos (MANSFIELD *et al.*, 2001).

Patotipo de *E. coli* enteropatogênica é citada por Ludlage e Mansfield, (2003), como um dos principais causadores de diarreia hemorrágica em colônias de *C. jacchus* mantidos em cativeiro. Segundo os autores, a presença de carreadores assintomáticos é comum e a infecção por patotipo de *E. coli* enteropatogênica pode persistir por vários anos mesmo após a realização do tratamento. A contaminação se dá pela via fecal-oral e as principais formas de introdução da patotipo de *E. coli* enteropatogênica em colônias de saguis cativos são fômites contaminados e o contato com o homem ou PNH contaminados.

Utilizando métodos moleculares, Carvalho *et al.*, (2003), detectaram patotipo de *E. coli* enteropatogênica em amostras coletadas com suabes do reto e cólon de primatas neotropicais (*Callithrix* sp, *Alouatta fusca* e *Saguinus fuscicollis*) sem sinais clínicos de doença entérica e animais que vieram a óbito com diarreia e/ou enterite. Dos 56 animais analisados (17 com alterações entéricas e 39 saudáveis) 18 (32%) carregavam o gene *eae*, sendo que 8 animais apresentavam sinais de doença entérica e 10 animais estavam aparentemente saudáveis. Os autores sugerem que PNH podem ser reservatórios naturais da patotipo de *E. coli* enteropatogênica e, portanto, representam fontes de infecção dessa bactéria para outros PNH e para o homem.

Sestak *et al.* (2003) realizaram um estudo molecular para identificar os patógenos associados com enterocolite crônica em 100 macacos rhesus (*M. mullata*) mantidos em um centro de pesquisa nos EUA. Em 25% dos animais

avaliados foi isolado patotipo de *E. coli* enteropatogênica e não houve diferença estatística significativa na incidência dessa bactéria entre os animais saudáveis e os que apresentavam diarreia crônica. Entretanto, foi verificada uma maior frequência de *S. flexneri* e *Y. enterocolitica* em animais com diarreia crônica quando comparados com os animais clinicamente saudáveis.

Martin *et al.* (2009) pesquisaram a ocorrência de genes de virulência em cepas de *E. coli* β hemolíticas, isoladas de fezes de símios (*M. mulatta* e *M. fascicularis*) aparentemente saudáveis utilizados em pesquisas biomédicas. Em 27% (25/92) das amostras analisadas foram isoladas *E. coli* β hemolíticas sendo que cinco destas eram produtoras do fator necrosante citotóxico-1 (CNF1) que é geralmente produzido por estirpes de *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Kindlovits e Kindlovits, (2009) encontraram relatos da presença de diarreia aquosa, congestão, edema e necrose da mucosa do íleo e cólon em saguis infectados com *E. coli* hemolítica.

Outros sinais clínicos associados à infecção por sorotipos patogênicos de *E. coli* em PNH são: traqueíte, bronquite, meningite, pneumonia, secreção ocular muco purulenta, dispneia e morte súbita (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

David *et al.* (2009) isolaram *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras que foram coletadas durante exames *post-mortem* realizados em exemplares de *C. jacchus* que apresentavam colite e pneumonia e de micos (*Saguinus* spp) com pneumonia e peritonite. Por outro lado, Mugisha *et al.*, (2014) isolaram *E. coli* e *K. pneumoniae* na cavidade oral de chipanzés saudáveis mantidos em um santuário africano.

A infecção por *K. pneumoniae* é citada como causadora de significativa mortalidade em *C. jacchus* especialmente, em animais imunossuprimidos e filhotes. Diarreia, hipotermia e pneumonia são os sinais clínicos mais relacionados, entretanto a morte súbita também pode ocorrer (LUDLAGE & MANSFIELD, 2003). Além dos quadros pneumônicos e entéricos, a infecção por *K. pneumoniae* em PNH também pode desencadear quadros sépticos (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009). Alguns autores citam que abscesso subcutâneo é um achado comum em *S. sciureus* infectado por *K. pneumoniae* (RICHARD, 1989; CHIKWETO *et al.*, 2013).

Sánchez *et al.* (2006) relatam uma elevada mortalidade de filhotes de *Aotus* sp. nascidos em cativeiro no Peru, por pneumonia causada por *E. coli* e *K. pneumoniae*. Esses patógenos também foram isolados em lêmures (*Lemur catta*) mantidos em cativeiro que apresentavam doença gastrointestinal e em lêmures cativos e selvagens clinicamente saudáveis (VILLERS *et al.*, 2008). Apesar de ser comumente

relacionada a infecções em filhotes de PNH, Steyn *et al.* (1976) relatam uma alta incidência de *Klebsiella spp.* em babuínos adultos que desenvolveram diarreia em cativeiro, sendo essa bactéria isolada em 55% dos animais doentes.

No Brasil, Verona (2009) isolou *K. pneumoniae* a partir de suabes orais de *C. jacchus* saudáveis, de vida livre e de cativeiro. Contudo, Pisharath *et al.* (2005) descrevem a ocorrência de septicemia e peritonite secundária a infecção por *K. pneumoniae* em seis exemplares de *C. jacchus* mantidos em cativeiro nos EUA.

Nos últimos anos, uma nova forma invasiva de *K. pneumoniae* foi relatada em humanos e PNH causando osteomielite, meningite e múltiplos abscessos no pulmão, fígado, cérebro, mesentério, segmentos dos intestinos delgado e grosso e na parede abdominal. A *K. pneumoniae* invasiva é associada a um fenótipo conhecido como fenótipo de hiper mucoviscosidade (HMV). O HMV fenótipo foi isolado em exemplares de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops sabaues*) oriundos da ilha caribenha de Santa Kitts, a partir de fluidos de abscessos e suabes orais e retais (TWENHAFEL *et al.*, 2008; WHITEHOUSE *et al.*, 2010; SOTO *et al.*, 2012).

2.2.2 Pseudomonas

São bastonetes Gram-negativos aeróbicos, móveis, oxidase positiva e não fermentadores de carboidratos. Várias espécies excretam pigmentos solúveis que difundem pelo meio de cultura, como a *P. aeruginosa*. São comumente encontrados no solo e em outros ambientes naturais, sendo que algumas espécies podem causar enfermidades em humanos, animais e plantas (TORTORA *et al.*, 2012; MENEZES-COSTA *et al.*, 2013).

As *Pseudomonas* são capazes de crescer em alguns antissépticos, como compostos de amônio quaternário e a resistência à maioria dos antibióticos tem sido uma fonte de preocupação médica. Essa resistência está relacionada com as porinas da parede celular, que controlam a entrada de moléculas através da parede e com diversos sistemas de bombas de efluxo que ejetam antibióticos da célula antes que eles possam atuar (TORTORA *et al.*, 2012).

A *P. aeruginosa* é a espécie de maior importância médica do gênero, tanto para humanos como para PNH (VELA *et al.*, 2006). Em PNH essa espécie é encontrada na pele e também faz parte da microbiota intestinal, sendo considerado um importante patógeno oportunista em calitriquídeos debilitados, podendo

ocasionar abscessos na pele, diarreia, pielonefrite, pneumonia, conjuntivite, peritonite, miocardite e septicemia (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

Coutinho *et al.* (2007) isolaram *P. aeruginosa* a partir de hemocultura de um exemplar de *C. jacchus* de vida livre capturado gravemente debilitado, apresentando desidratação, hipotermia, hipotensão e dermatite descamativa generalizada. A análise histopatológica dos pulmões revelou a presença de pneumonia intersticial. No mesmo trabalho, também foi realizada pesquisa para diferentes agentes virais, sendo o resultado positivo para *Adenovírus*. De acordo com os autores, a infecção bacteriana foi secundária a adenovirose.

David *et al.* (2009) isolaram *P. aeruginosa* em amostras do fígado e intestino coletadas durante a realização de exames *post-mortem* em saguis (*C. jacchus*) que apresentavam alterações morfológicas compatíveis com hepatite e colite. Septicemia por *Pseudomonas spp.* é relatada em micos (*Saguinus oedipus*) mantidos em zoológico (LEONG *et al.*, 2004).

Pseudomonas spp. foi isolada em 19,54% babuínos que apresentaram quadros de diarreia após a chegada no cativeiro (STEYN *et al.*, 1976). Smith *et al.*, (2006) encontraram *Pseudomonas spp.* na vesícula biliar de micos-leões-dourados e saguis cativos que desenvolveram colelitíase. Contudo, a ocorrência de *Pseudomonas spp.* em animais saudáveis também é relatada. Brown *et al.* (1973) encontraram *Pseudomonas spp.* em amostras da cavidade oral de micos (*S. oedipus*) e Mugisha *et al.*, (2014) isolaram *P. aeruginosa* em 50% das amostras de suabe oral de chimpanzés mantidos em um santuário na África.

Recentemente, uma nova espécie de *Pseudomonas*, a *P. simiae* foi isolada a partir de amostras do fígado, pulmão e cérebro de dois exemplares de *Callithrix geoffroyi* que vieram a óbito subitamente. No exame *post-mortem* foi encontrada pneumonia broncointersticial aguda e glomerulonefrite (VELA *et al.*, 2006).

2.2.3 Campylobacter

São bactérias Gram-negativas divididas em 17 espécies e seis subespécies, que possuem mobilidade, formato curvo ou espiralado e são microaerófilas, ou seja, requerem uma atmosfera de baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de dióxido de carbono para crescer em meio de cultura específico. (TORTORA *et al.*, 2012).

As espécies termotolerantes *C. coli* e *C. jejuni*, são as responsáveis pela ocorrência de infecções gastrintestinais em primatas humanos e não humanos e a transmissão pode se dar pela via oral de forma indireta, através da ingestão de água ou alimentos de origem animal contaminados ou pelo contato direto com fezes contaminadas (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

Os sintomas relatados em símios são enterocolite moderada ou grave, febre, dor abdominal, diarreia aquosa com ou sem sangue e mialgia, contudo, essas espécies podem estar presentes em fezes de PNH saudáveis, portanto, a infecção nesses animais torna-se extremamente relevante sob o ponto de vista da saúde pública, visto que estes podem representar importantes reservatórios (PAZZAGLIA *et al.*, 1994; KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

Entre as décadas de 70 e 80 diferentes autores descrevem o envolvimento de *Campylobacter* spp. na etiologia de diarreias em PNH do velho e novo mundo mantidos em cativeiro (BONCYK *et al.*, 1972; TRIBE *et al.*, 1979; TRIBE & FRANK, 1980; MORTON *et al.*, 1981; BRYANT *et al.*, 1983; TRIBE & FLEMING, 1983; HIRD *et al.*, 1984).

Moore (1985) relata que *C. jejuni* foi isolado durante vários anos, em suabes retais de micos (*Saguinus oedipus*) saudáveis e com colite, que faziam parte de diferentes colônias mantidas no New England Regional Primate Research Center. Estudo retrospectivo realizado por Leong *et al.* (2004) demonstrou que enterites causadas por *Campylobacter jejuni* estão entre as principais causas de mortalidade de *S. oedipus* mantidos em zoológicos nos EUA.

Pazzaglia *et al.* (1994) descrevem a ocorrência de surtos recorrentes de diarreias em uma colônia de 10 orangotangos que, segundo os autores, ocorreram devido a diferentes formas de transmissão de *C. coli* e *C. jejuni*, que incluíram transmissão fecal-oral de hospedeiro para hospedeiro, consumo de alimentos e água diretamente contaminados com fezes de aves e através de vetores, contaminados com fezes de aves.

Campylobacter foi o único enteropatógeno detectado em fezes de diferentes espécies de PNH do velho mundo, mantidos no Adler Breeding Center, aparentemente saudáveis e com diarreia, e em conteúdo intestinal de animais que vieram a óbito devido à enterite infecciosa aguda. O DNA do *C. jejuni* foi detectado em amostras de 51,3% dos animais saudáveis, 69,6% dos animais doentes e 92,3% dos animais que vieram a óbito (KALASHNIKOVA *et al.*, 2002). Trabalho realizado

posteriormente, por Ardasheliya *et al.* (2011), demonstra que a incidência de *C. jejuni* entre os PNH que apresentavam enterite infecciosa aguda e que vieram a óbito devido a essa doença continuava alta porém, outras bactérias enteropatogênicas também foram responsáveis pelo desenvolvimento de enterite aguda nos animais.

Em contraste, Okwori *et al.* (2013) verificaram uma baixa incidência (5,6%) e uma prevalência constante de *Campylobacter* spp. nas espécies de símios do velho mundo mantidas em um zoológico na Nigéria. Todos os animais encontravam-se aparentemente saudáveis no decorrer do estudo.

Andrade *et al.* (2007) acompanharam a ocorrência de *Campylobacter* spp. em uma colônia de macacos rhesus (*M. mullata*) mantidos no Departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) durante sete anos. Apesar das alterações que foram realizadas no manejo dos animais, relacionadas à alimentação, à higienização e às instalações, a frequência de *Campylobacter* spp. entre os animais foi crescente no decorrer do estudo, principalmente entre indivíduos adultos e subadultos.

Contudo, Andrade *et al.* (2009) constataram que as mudanças realizadas no manejo de uma criação de macacos-de-cheiro (*Saimiri* spp.), também mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz foram eficazes, levando ao decréscimo na incidência de *Campylobacter* entre os animais, que se tornou ausente ao final dos sete anos de acompanhamento.

Griffith *et al.* (2008) isolaram *C. jejuni* em amostras de fezes de diferentes espécies de saguis e micos-leões mantidos em um zoológico europeu. Todos os animais apresentavam-se saudáveis no momento do estudo. *C. jejuni* e *C. coli* também foram isoladas em amostras fecais de lêmures saudáveis mantidos em cativeiro, entretanto, essas bactérias não estavam presentes em amostras de lêmures de vida livre (VILLERS *et al.* 2008).

No Brasil, Verona (2009) isolou *Campylobacter* spp. a partir de suabes das regiões orofaríngea e anal de quatro saguis (*C. jacchus*) que foram apreendidos pelo Centro de Triagem do IBAMA do Rio de Janeiro. Essas bactérias não foram isoladas nas amostras oriundas dos saguis capturados em vida livre. Contudo, na África, Whittier *et al.* (2010) utilizando técnicas moleculares detectaram 87% de prevalência de *Campylobacter* spp. em 157 amostras de fezes de gorilas da montanha (*Gorilla beringei beringei*) de vida livre.

2.2 RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE PNH

A exposição a antibióticos representa a principal pressão seletiva para o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos em humanos e animais, contudo, o contato com bactérias resistentes presentes no ambiente também pode levar a uma colonização por esse tipo de microrganismo. Segundo alguns autores, os mecanismos responsáveis pela ocorrência de bactérias resistentes em animais selvagens de vida livre ainda são pouco compreendidos e estudados (ROLLAND *et al.*, 1985; ALLEN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014; RADHOUANI *et al.*, 2014).

Os animais selvagens são considerados atualmente potenciais reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos incluindo, populações que ocorrem em áreas remotas, com baixa influência antrópica. Portanto, o estudo da ocorrência de resistências a antimicrobianos em animais selvagens pode ampliar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no surgimento de bactérias resistentes e prever o surgimento de novos patógenos resistentes (ALLEN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014; RADHOUANI *et al.*, 2014).

Em PNH, Good *et al.* (1969) verificaram multirresistência ao cloranfenicol, diidroestreptomicina e tetraciclina em espécies de *Salmonella* e *Shigella* isoladas tanto de PNH recém-capturados quanto de animais já acondicionados em um centro de pesquisas americano. De acordo com os autores, a transferência espontânea por conjugação de fatores que conferem resistência, poderia explicar essas resistências.

Rolland *et al.* (1985) relatam que populações selvagens de babuínos (*Papio cynocephalus*) africanos que tinham contato com o lixo e restos de comida de humanos hospedavam uma grande diversidade de bactérias entéricas resistentes a antibióticos quando comparados com as populações dessa espécie que ocorriam em áreas com praticamente nenhum distúrbio antrópico. Os autores constataram que algumas bactérias encontradas possuíam a capacidade de transferir *in vitro* plasmídeos que carreavam genes de resistência. A frequência de transferência foi maior entre as bactérias multirresistentes.

Em contraste, Routman *et al.* (1985) descrevem que não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos em babuínos africanos (*P. cynocephalus*) que ocorriam em área com forte pressão antrópica quando comparado com animais que ocorriam em áreas

com pouca pressão antrópica. Os autores argumentam que diferenças na metodologia, a não discriminação de espécies de coliformes e potenciais diferenças no nível de exposição a antibióticos e/ou bactérias resistentes podem explicar as divergências de resultados dos dois estudos.

Tribe e Fleming (1983) relatam a ocorrência de multirresistência a 5 antimicrobianos (cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, neomicina e sulfametoxazol/trimetroprim) em sorotipos de *Shigella flexneri* isolados de *Macaca fascicularis* mantidos em cativeiro. Os autores acrescentam ainda, que nenhum dos 80 isolados de *Salmonella* e *Shigella*, apresentou sensibilidade a todos os 5 antibióticos testados.

Em surto de shigelose causado pela *S. sonnei* em calitriquideos (*C. jacchus* e *S. nigricollis*) mantidos em cativeiro, os autores constataram que a sensibilidade dos isolados a maioria dos antibióticos testados diminuiu consideravelmente após a instituição do tratamento, contudo a taxa de resistência foi declinando após o término do mesmo. Os autores alertam para o fato de que a instituição de terapia antimicrobiana em PNH cativos pode resultar na produção e eliminação no ambiente de clones de bactérias resistentes (COOPER & NEEDHAM, 1976).

Da Silva *et al.* (2013) descrevem que não houve diferenças no perfil de resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas isoladas da mucosa vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) cativos. A microbiota das fêmeas e dos machos demonstrou elevada resistência a ampicilina, cefalotina e nitrofurantoina. Os antimicrobianos mais eficientes foram levofloxacina, ciprofloxacina e meropenem.

Uma cepa de *Salmonella* Worthington isolada de um exemplar de *C. argentata*, clinicamente saudável, foi sensível a maioria dos antimicrobianos testados, entre eles, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, cefalotina, ampicilina, e tobramicina, contudo apresentou resistência à tetraciclina, carbenicilina e ao sulfametoxazol/trimetroprim (LOUREIRO *et al.*, 1985).

Knöbl *et al.* (2011) relatam que apenas a tetraciclina foi ineficiente contra uma cepa de *S. yoruba* que levou a óbito um exemplar de sagui mantido em cativeiro. O isolado foi sensível a cloranfenicol, gentamicina, sulfametoxazol/trimetroprim e enrofloxacina. Em outro relato de salmonelose fatal em um gorila mantido em um zoológico brasileiro, foi isolado *S. enterica* (sorotipo Infantis) que se mostrou resistente à penicilina e à lincomicina e sensível a amoxicilina, sulfametoxazol/

trimetoprim, ampicilina, cefalotina, enrofloxacina e gentamicina (PAIXÃO *et al.*, 2014).

PISHARATH *et al.* (2005) relatam que cepas de *K. pneumoniae* isoladas a partir de exudato peritoneal e amostras do fígado e baço de exemplares de *C. jacchus* que vieram a óbito devido a peritonite e septicemia, foram sensíveis a maioria dos antibióticos testados exceto, para ampicilina e carbenicillina. Resistência a ampicilina também foi encontrada em *K. pneumoniae* isolada de abscesso retroperitoneal de um *S. sciureus* que veio a óbito (CHIKWETO *et al.*, 2013).

Uma alta sensibilidade a antimicrobianos foi verificada em cepas de *K. pneumoniae* HMV e não-HMV isoladas das cavidades oral e anal e de abscessos de macacos verdes africanos (*Chlorocebus aethiops sabaesus*) mantidos em cativeiro. A concentração inibitória mínima (MIC) de 23 antibióticos foi avaliada sendo que apenas a ampicilina e nitrofurantoina mostraram potencial intermediário de inibição para ambos os tipos de cepas (SOTO *et al.*, 2012).

Martin *et al.* (2009) relatam uma elevada resistência a cefalotina em cepas de *E. coli* beta-hemolíticas isoladas de macacos rhesus (*M. mulatta* e *M. fascicularis*) saudáveis mantidos em cativeiro. Dos 6 isolados testados, 5 foram resistentes e 1 apresentou susceptibilidade intermediária a esse antibiótico. Um isolado apresentou multirresistência a ampicilina, ceftioxime e sulfametoxazol/trimetoprim e outro isolado a gentamicina, tetraciclina sulfametoxazol/trimetoprim.

Resistência a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, oxacilina, eritromicina, vancomicina e clindamicina foi verificada em cepas de *Y. enterocolitica* responsáveis por causar o óbito de 46 macacos verdes africanos (*Chlorocebus aethiops sabaesus*) mantidos em cativeiro (SOTO *et al.*, 2013).

Multirresistência aos antibióticos ampicilina, tetraciclina, neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim foi verificada por Pazzaglia *et al.* (2005) em *Campylobacter* spp. isoladas de orangotangos cativos aparentemente saudáveis e com diarreias recorrentes. Os antimicrobianos que apresentaram 100% de inibição foram cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina e eritromicina.

Todas as cepas de *C. jejuni* isoladas de diferentes espécies de calitriquídeos saudáveis mantidos em um zoológico na Irlanda foram sensíveis à tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ácido nalidíxico, gentamicina e ciprofloxacina. Resistência só foi observada aos beta-lactâmicos penicilina e cefalexina (STIRLING *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

Esta investigação tem como objetivos:

- Determinar a ocorrência e a diversidade das bactérias Gram-negativas que compõem a microbiota gastrintestinal do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) e de híbridos de saguis (*Callithrix* spp.) introduzidos na região de ocorrência natural do mico-leão-dourado;
- Determinar o papel destas bactérias Gram-negativas, com ênfase àquelas do trato gastrintestinal, descritas como potenciais agentes etiológicos de doenças em callitriquídeos;
- Avaliar, nestes micro-organismos, o padrão de resistência fenotípica aos antimicrobianos de importância para callitriquídeos, presentes na microbiota gastrintestinal de híbridos de saguis e do mico-leão dourado em vida livre;
- Estimar se a presença dos híbridos de saguis representa ameaça para a saúde das populações de mico-leão-dourado e, conseqüentemente, a sua conservação *in situ* no estado do Rio de Janeiro, através da análise estatística da ocorrência de bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas em grupos de mico-leão-dourado e saguis que coabitam nas mesmas áreas e, em grupos de micos-leões-dourados que ocorrem em áreas com a ausência dos invasores.

4. JUSTIFICATIVAS

- São poucos os estudos sobre a saúde de espécies de *Callithrix* invasoras em ambiente urbano e natural. Estudos desta natureza são importantes, especialmente na cidade do Rio de Janeiro, pois essas espécies circulam amplamente tanto em áreas de floresta e Unidades de Conservação, como em áreas urbanas competindo por recursos com as espécies autóctones que já vivem sob a pressão da perda crescente de habitat devido às ações antrópicas;
- Estudos comportamentais comprovam a existência de um alto grau de interação e competição direta por recursos entre saguis e micos-leões-dourados e, a presença dos sagüis associado à perda do habitat, representam as principais ameaças à conservação do mico-leão-dourado;
- As informações disponíveis sobre os riscos de transmissão de doenças dos saguis para os micos-leões são restritas a parasitas intestinais e sanguíneos. Estudos iniciais a campo mostraram que os sagüis albergavam parasitas intestinais potencialmente patogênicos para o mico-leão-dourado que não tinham sido encontrados na espécie nativa;
- Estudos de caracterização da microbiota bacteriana e de avaliação do potencial de resistência a antimicrobianos ainda não foram realizados na região alvo deste estudo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 QUESTÕES ÉTICAS

Esta pesquisa possui autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através da certificação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio) (nº de autorização 10596-2) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Norte Fluminense (protocolo 148).

5.2 ÁREAS DE ESTUDO

Para que fosse possível realizar comparações sobre as bactérias entéricas Gram-negativas de saguis, micos-leões-dourados que habitam áreas com saguis e micos-leões-dourados que habitam áreas sem a presença dos invasores, os animais foram capturados em dois ambientes distintos: Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN), que são fragmentos de Mata Atlântica localizados dentro de fazendas, onde coabitam grupos de saguis e micos-leões-dourados e Reserva Biológica (ReBio) onde são encontrados apenas grupos de micos-leões-dourados.

RPPNs de cinco fazendas, todas localizadas no município de Silva Jardim, Rio de Janeiro, foram amostradas: fazenda Pacoty, fazenda Afetiva, fazenda Boa Esperança, Fazenda Tamarins e Fazenda Santa Helena. As ReBios amostradas foram a ReBio Poço das Antas, localizada no município de Silva Jardim e ReBio União, cuja área total atinge os municípios fluminenses de Casemiro de Abreu e Rio das Ostras.

5.3 CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os animais foram capturados com armadilhas do modelo Tomahawk (18X18X60cm) contendo bananas como iscas, que foram dispostas sobre plataformas de alimentação, previamente construídas a 1,5 m do solo pela equipe de campo da Associação Mico Leão Dourado (AMLD) (figura 4). Após a captura, as armadilhas foram imediatamente cobertas com pano a fim de minimizar o stress de

captura. Os animais foram transportados ao laboratório da AMLD onde foi realizado anestesia, exame clínico e coleta de material biológico.

O peso corporal de cada indivíduo foi estimado pela diferença do peso da armadilha vazia em relação ao peso da armadilha com o animal. Em seguida, o animal foi contido dentro da armadilha manualmente por encerramento com auxílio de uma toalha e anestesiado por via intramuscular no músculo bíceps femoral com Cloridrato de Ketamina na dose de 10 mg.kg^{-1} administrado com seringa de 1ml e agulha 13X4. Estando o animal devidamente anestesiado, procedeu-se a avaliação clínica que consistiu na pesagem e inspeção minuciosa de olhos, orelhas, narinas, ânus, vulva, glândulas mamárias, testículos e pele. As alterações encontradas foram registradas em ficha clínica individual (apêndice A).

Após o exame clínico foram coletadas amostras em duplicata da cavidade oral e anal (figuras 5 a 7) com suabes Cary-Blair (Copon, Itália), as quais foram identificadas e mantidas sob refrigeração a 4°C até o processamento. Após a coleta das amostras, os animais foram colocados nas armadilhas de captura, onde foram mantidos em ambiente aquecido e escuro até retornarem da anestesia. No dia seguinte, os animais foram soltos no mesmo local da captura.



Figura 4: Disposição das armadilhas na plataforma de alimentação construída pela equipe de campo da AMLD para captura de sagui (*Callithrix sp.*) e mico-leão-dourado (*L. rosalia*). Foto: Arquivo pessoal.



Figura 5: coleta de amostra da cavidade oral de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) com uso de suabe. Foto: Arquivo pessoal.



Figura 6: coleta de amostra da cavidade anal de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) com uso de suabe. Foto: Arquivo pessoal.



Figura 7: Híbrido de sagui (*Callithrix* sp.) capturado na região de ocorrência do mico-leão-dourado (*L. rosalia*). O cruzamento de *C. jacchus* com *C. penicillata* gera descendentes com tufos de pelo auricular grisalhos. Foto: Arquivo pessoal.

5.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

5.4.1 Família Enterobacteriaceae

O cultivo e a identificação dos membros da família Enterobacteriaceae foram realizados seguindo metodologia descrita por Costa & Hofer (1972) e Brasil (2011).

Os suabes foram semeados em meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia, Índia), que foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após esse período, as colônias morfologicamente diferentes foram novamente semeadas em ágar EMB e incubadas a 37°C por 24h com a finalidade de obter massa bacteriana pura e suficiente para a realização dos testes bioquímicos.

Com o intuito de otimizar o isolamento de *Salmonella* spp., após a semeadura do suabe em meio ágar EMB, o mesmo foi mergulhado em 2,0 mL de caldo Rappaport Vasiliadis (OXOID, UK) e incubado em banho-maria a 42°C por 18-24h. Após esse período, o caldo foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e o pellet foi semeado em meio ágar Hecktoen (Himedia, Índia) e incubado a 37°C por 24h. 3 a 4 colônias suspeitas foram selecionadas e novamente semeadas em ágar Hecktoen e incubadas a 37°C por 24h para a realização dos testes bioquímicos.

Na caracterização bioquímica foram avaliadas as seguintes características: fermentação de carboidratos (glicose, sacarose, e lactose) com ou sem produção de gás, produção de indol, sulfato de hidrogênio (H₂S), urease, ácidos fortes (lático, acético e fórmico) e acetoína, utilização de citrato, capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina e presença de motilidade.

A fermentação de açúcares e a produção de H₂S foram verificadas em meio ágar TSI (Triple Sugar Iron) (Himedia, Índia) a partir da mudança da cor do meio para amarelo e presença de precipitado negro, respectivamente. Para avaliar a produção de indol e a mobilidade foi utilizado o meio ágar SIM (Sulfide, Indole and Motility) (Himedia, Índia). A mobilidade foi evidenciada através da presença de turvação do meio e a produção de Indol através da mudança de cor da superfície do meio para rosa após a adição de duas gotas do reagente de Kovacs (Laborclin, Brasil).

As produções de ácidos fortes e acetoína, a partir da fermentação da glicose, foram avaliadas nas provas do Vermelho de Metila (VM) e de Voges-Proskauer (VP), respectivamente. Para cada prova, uma amostra da colônia foi inoculada em 2,0 ml de caldo BHI (Infusion Heart Brain) (Himedia, Índia). A mudança de cor para vermelho da suspensão, na adição de 1,0 mL do reagente vermelho de metila indica a presença de ácidos fortes. Por outro lado, a produção de acetoína é verificada pela presença de um halo vermelho na superfície após a adição de 4 gotas de hidróxido de potássio 40% e 1,0 mL de α -naftol 5%.

A utilização do citrato como fonte de carbono foi avaliada utilizando o meio ágar citrato (Difco, EUA). A mudança de cor do meio para azul após o período de incubação indica positividade. A produção da enzima urease foi verificada através da inoculação de uma amostra da colônia em caldo ureia (INLAB, Brasil). A presença da degradação da ureia a amônia é evidenciada a partir da mudança de cor do meio para rosa.

A capacidade de descarboxilação da lisina e da ornitina foi verificada a partir da inoculação de uma amostra da colônia em caldo descarboxilase (Difco, EUA) com 1% de D-lisina e D-ornitina (INLAB, Brasil). A utilização destes aminoácidos foi indicada pela mudança da coloração do meio para roxo. As leituras dos resultados de todas as provas bioquímicas descritas acima foram feitas após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 48h dos respectivos meios inoculados.

Quando a combinação dos resultados das provas bioquímicas manuais não era conclusiva, foram realizados testes bioquímicos automatizados utilizando o kit ID32E (Biomeriéux, França), com leitura automatizada pelo equipamento MiniApi® (Biomeriéux, França).

5.4.2 *Pseudomonas* spp

Foram consideradas suspeitas para *Pseudomonas* spp as colônias que cresceram no ágar EMB que não fermentaram os açúcares após a incubação no meio TSI. Essas colônias foram então submetidas a testes bioquímicos automatizados utilizando o GN Test Kit (Biomeriéux, França), com leitura automatizada pelo equipamento MiniApi® (Biomeriéux, França).

5.4.3 *Campylobacter* spp

A pesquisa de *Campylobacter* spp. foi realizada pela equipe do Setor de Campylobacter do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO) da FIOCRUZ. Amostras de suabes provenientes de cavidade oral e anal de 22 saguis e 31 micos-leões-dourados (16 micos-leões de RPPN e 15 micos-leões de Rebio) foram encaminhadas refrigeradas em caixa isotérmica. Inicialmente, as amostras foram semeadas em meio ágar Columbia enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro (5%) ou carvão ativado (0,4g%), suplementado com solução de FBP e incubadas por 48 horas à temperatura de 42°C em atmosfera de microaerofilia constituída de 5 a 7% de O₂. As colônias com brilho d'água foram fixadas em lâminas e coradas pelo método de Gram, para observação de células com morfologia típica (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000).

Para a identificação bioquímica, foi realizada uma suspensão correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland em 0,4 mL de uma solução aquosa de Hipurato de Sódio em 1% (g/v). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 2 horas, em constante agitação. Após este tempo, adicionou-se 0,2 mL do reagente de ninhidrina em 3,5% (g/v), mantendo-se os tubos por 10 minutos em banho-maria a 37°C sem agitação. A formação de um anel roxo na superfície dos tubos significou reação positiva. Como controles do teste, foram utilizadas amostras de *Streptococcus agalactiae* (positivo) e *Listeria monocytogenes* (negativo).

Para a identificação genotípica, o DNA genômico foi obtido através da lise celular por tiocianato de guanidina (PITCHER *et al.*, 1989). A Multiplex-PCR para identificação das espécies mais frequentes de *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*) foi realizada seguindo o procedimento descrito por Harmon *et al.* (1997) empregando os iniciadores pg 3 (5' GAA CTT GAA CCG ATT TG 3') e pg 50 (5' ATG GGA TTT CGT ATT AAC 3') para a identificação do gene *flaA* (produto de 460pb) e C1 (5' CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT 3') e C4 (5' GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T 3') para a identificação de uma sequência única de *C. jejuni* (produto de 160pb). As cepas de *C. jejuni* ATCC 33560 e de *C. coli* ATCC 33559 foram usadas como controles positivos na PCR.

A revelação dos resultados da PCR foi feita através da eletroforese em gel de agarose em 1,0%, utilizando TBE 0,5X e o padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Ao final, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio e visualizado sobre luz UV.

5.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Foi realizado antibiograma nas bactérias Gram-negativas isoladas que são descritas na literatura como potencialmente patogênicas a calitriquideos. Onze antibacterianos foram testados para as enterobactérias: tetraciclina (TET, 30µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20/10µg), gentamicina (GEN, 10µg), cefoxitina (CFO, 30µg), tobramicina (TOB, 10µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg), enrofloxacina (ENO 5µg), ciprofloxacino (CIP, 5µg) e sulfametaxazol/ trimetoprim (SXT, 25µg). Nos isolados de *P. aeruginosa* foi verificada a susceptibilidade a seis antibióticos: tobramicina, gentamicina, ciprofloxacino, enrofloxacina, cefotaxima (CFX, 30µg) e amicacina (AMI, 30µg).

Os antibióticos foram testados de acordo com a técnica de Kirby-Bauer Difusão (BAUER *et al.*, 1966). Uma pequena amostra da colônia bacteriana crescida por 24 horas em ágar Müller Hinton (Himedia, Índia) foi diluída em 2,0 mL de solução salina 0,85% estéril até alcançar a escala de 0,5 de McFarland (10^8 bactérias/mL) que foi padronizada em densitômetro (Densimat®, Biomeriêux, França). A suspensão foi semeada com suabe estéril por enduto contínuo em placa de petri contendo 20 mL de ágar Müller Hinton. Em seguida, os discos dos antibióticos (Laborclin, Brasil)

foram adicionados às placas e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após esse período, foi avaliado o perfil de crescimento bacteriano através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição existentes em volta de cada disco de antibiótico. De acordo com o valor do diâmetro dos halos de inibição formados, a susceptibilidade ao antibiótico foi caracterizada como: sensível, intermediária ou resistente segundo recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Com a finalidade de avaliar a ocorrência das bactérias de importância médica encontradas nos grupos de mico-leão-dourado que ocorrem em áreas com a presença dos invasores (RPPNs), foi utilizado o teste do qui-quadrado ($P \leq 0,05$) para comparar os casos positivos desses grupos com os casos positivos dos grupos da espécie invasora e dos grupos de micos-leões que habitam áreas sem a presença dos invasores (Rebio). Para tanto, utilizou-se o programa Sistema para Análises Estatísticas SAEG 9.0 (UFV, 2009).

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS

No total, foram coletadas amostras de suabes das cavidades oral e anal de 151 animais, sendo 50 híbridos de saguis, 50 micos-leões-dourados que habitam áreas com a presença de saguis (RPPNs) e 51 micos-leões que habitam áreas sem a presença de saguis (ReBios). Na tabela 1 encontra-se a distribuição dos animais capturados com relação ao tipo de ambiente e ao local de ocorrência dos mesmos.

Tabela 1: Áreas de ocorrência dos micos-leões-dourados (*L. rosalia*) e dos híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) capturados.

Tipo de ambiente	Local	Nº animais capturados	
		<i>L. rosalia</i>	<i>Callithrix</i> sp.
RPPN	Fazenda Pacoty	2	7
	Fazenda Afetiva	17	28
	Fazenda Boa Esperança	20	11
	Fazenda Tamarins	8	4
	Fazenda Santa Helena	3	nc
ReBio	Poço das Antas	22	nc
	União	29	nc
Total		101	50

RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; ReBio: Reserva Biológica; nc: não capturado.

Cerca de 20% dos micos-leões de RPPNs foram capturados durante o inverno, (março e junho de 2013) e 80% durante a primavera (setembro e novembro de 2012 e setembro de 2013). Aproximadamente 70% dos micos-leões de ReBio foram capturados durante o inverno e o outono (agosto de 2012, abril e junho de 2013 e entre abril e maio de 2014); 20% dos animais foram capturados no verão (janeiro de 2013 e entre janeiro e fevereiro de 2014) e apenas 10% foram capturados durante a primavera (outubro de 2012, dezembro de 2011 e novembro de 2013).

Do total de saguis amostrados, 34% dos animais foram capturados na primavera (novembro de 2011 e 2012 e setembro de 2014); 34% foram capturados no inverno (junho e agosto de 2014) e 32% dos animais foram capturados no verão (fevereiro de 2013 e 2014 e março de 2014).

Com relação à faixa etária dos animais amostrados, dentre os micos-leões capturados nas ReBios, 29 (56,9%) eram adultos (18 machos e 11 fêmeas), 8 (15,7%) eram jovens (4 machos e 4 fêmeas) e 14 (27,4%) eram filhotes (10 machos e 4 fêmeas). Dos micos-leões capturados em RPPNs, 27 (54%) eram adultos (14 machos e 13 fêmeas), 11(22%) eram jovens (4 machos e 7 fêmeas) e 12 (24%) eram filhotes (8 machos e 4 fêmeas). Do total de saguis capturados, 42 (84%) eram adultos, 5 (10%) eram jovens e 3 (6%) eram filhotes.

No exame clínico, foi verificado que 3 fêmeas de mico-leão-dourado capturadas em ReBio e 2 fêmeas capturas em RPPNs estavam prenhas. Em um macho jovem de mico-leão foi encontrado ectoparasita (carrapato). Um filhote fêmea de mico-leão capturada na ReBio Poço das Antas apresentava a cauda com tamanho reduzido. É provável, que esta redução tenha sido provocada durante um evento de fuga de algum predador natural. Seis fêmeas de sagui encontravam-se prenhas.

Em todas as faixas etárias, as médias da massa corporal dos micos-leões-dourados capturados nas RPPNs foram maiores quando comparadas às médias da massa corporal dos micos-leões capturados nas ReBios. Todos os animais amostrados encontravam-se aparentemente saudáveis no momento das capturas. Na tabela 2 encontram-se as características gerais dos animais capturados nos diferentes ambientes.

6.2 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS

Foram obtidos 655 isolados sendo 222 isolados de saguis, 219 isolados de micos-leões que habitam RPPNs e 214 isolados de micos-leões que ocorrem em ReBios. Do total de isolados obtidos dos saguis, 97 (43,9%) foram obtidos a partir de suabes da cavidade oral e 125 (56,3%) dos isolados foram obtidos a partir de suabes da cavidade anal. Do total de isolados obtidos dos micos-leões de RPPNs, 94 (43%) foram obtidos da cavidade oral e 125 (57%) foram obtidos da cavidade anal. 93 (43,4%) dos isolados de micos-leões que habitam ReBios foram da cavidade oral e 121 (56,6%) dos isolados foram obtidos da cavidade anal (figura 8).

Tabela 2: Características gerais dos micos-leões-dourados (*L. rosalia*) e híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) capturados.

Espécie	Tipo de ambiente	Faixa etária	Nº de animais capturados		Massa corporal média (g)
			Macho	Fêmea	
<i>L. rosalia</i>	RPPN (n=50)	Adulto	14	13(2)	597,4
		Jovem	4	7	449,1
		Filhote	8	4	363,6
	ReBio (n=51)	Adulto	18	11(3)	576,1
		Jovem	4	4	444,6
		Filhote	10	4	294
<i>Callithrix</i> sp.	RPPN (n=50)	Adulto	26	16(6)	370
		Jovem	1	4	270
		Filhote	2	1	184,6

RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; ReBio: Reserva Biológica; (nº de fêmeas prenhas).

Do total de bactérias Gram-negativas isoladas foram identificados 18 gêneros e 33 espécies, sendo que 22 espécies pertencem à família Enterobacteriaceae, 4 pertencem à família Pseudomonadaceae, 2 pertencem à família Alcaligenaceae e 1 espécie foi isolada das famílias Moraxellaceae, Comamonadaceae, Xanthomonadaceae e Campylobacteraceae (tabela 3). Seis espécies foram encontradas apenas em amostras de saguis: *Alcaligenes denitrificans*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophonas maltophilia* e *Campylobacter jejuni* e 8 espécies apenas em amostras de micos-leões-dourados: *Citrobacter koseri*, *Citrobacter sedlakii*, *Enterobacter cancerogenus*, *Leclercia adecarboxylata*, *Proteus vulgaris*, *Providencia retigeri*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Raoutella ornithinolytica*.

Das espécies de bactérias Gram-negativas relatadas na literatura como potencialmente patogênicas para calitriquídeos, quatro foram identificadas, sendo que três espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram encontradas tanto em amostras da cavidade oral quanto anal de saguis e micos-leões e um isolado de *Campylobacter jejuni* foi obtido a partir do suabe anal de um exemplar de sagui que foi capturado na fazenda Afetiva.

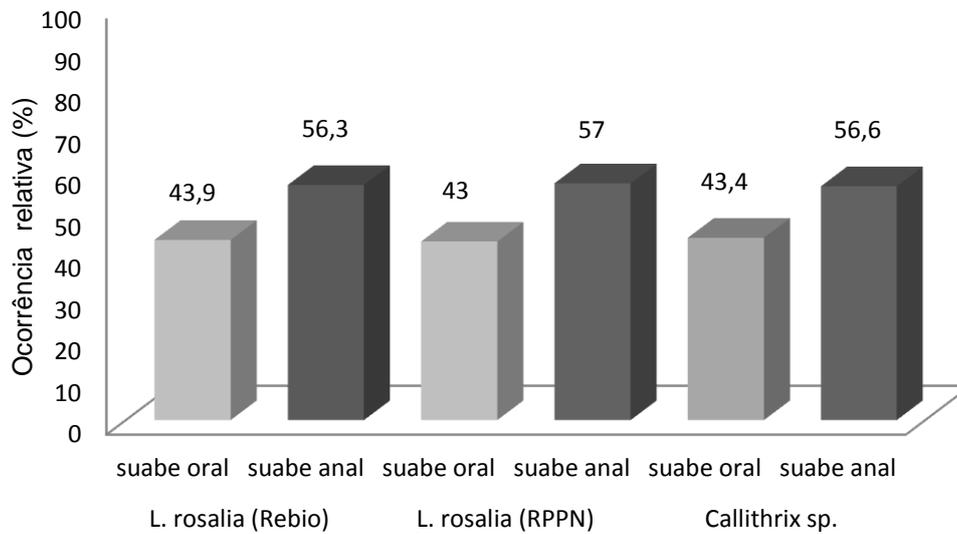


Figura 8: Distribuição das bactérias Gram-negativas isoladas das regiões oral e anal de híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) e micos-leões-dourados (*L. rosalia*) de vida livre. RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; ReBio: Reserva Biológica.

6.3 SUSCETIBILIDADES A ANTIMICROBIANOS

Foram realizados antibiogramas nas espécies de bactérias potencialmente patogênicas para calitriquídeos o que correspondeu a 151 isolados sendo, 117 isolados de *E. coli*, 13 isolados de *P. aeruginosa* e 21 isolados de *K. pneumoniae*.

Com relação aos isolados de *E. coli*, dos 11 antibióticos testados a cefalotina foi o antibiótico menos eficiente, pois 18 (15,4%) isolados foram resistentes e 54 (46,15%) apresentaram susceptibilidade intermediária, dos quais, 30 foram obtidos de saguis. O número de isolados de *E. coli* resistentes a cefalotina foi igual em saguis, micos-leões de RPPN e micos-leões de ReBio correspondendo a 6 isolados em cada. Todos os isolados foram sensíveis a tobramicina e florfenicol. Variações no efeito inibitório foram verificadas para 8 antibióticos: 1,7% dos isolados apresentaram resistência a enrofloxacin, sulfametoxazol/trimetropim e tetraciclina e 0,85% a amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina e ciprofloxacina. 0,85% das cepas apresentaram sensibilidade intermediária a gentamicina, ampicilina e ciprofloxacina.

Uma cepa de *E. coli* obtida a partir de suabe anal de um mico-leão-dourado que ocorre em RPPN apresentou resistência a 4 antibióticos: cefalotina, cefoxitina, ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico.

Tabela 3: Bactérias Gram-negativas encontradas nas regiões oral e anal de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) e híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) ocorridos em vida livre no Rio de Janeiro.

Bactéria	<i>L. rosalia</i> (Rebio) (n=51)			<i>L. rosalia</i> (RPPN) (n=50)			<i>Callithrix</i> sp. (n=50)		
	Oral	Anal	Animais colonizados	Oral	Anal	Animais colonizados	Oral	Anal	Animais colonizados
<i>Alcaligenes denitrificans</i>							2		4%
<i>Alcaligenes xylosoxidase</i>				1		2%	1		2%
<i>Acinetobacter baumannii</i>							1		2%
<i>Campylobacter jejuni</i>							1		2%
<i>Citrobacter diversus</i>	3		5,9%	5		10%	1	2	6%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	9	21,5%	5	16	40%	6	10	26%
<i>Citrobacter koseri</i>	1		1,9%						
<i>Citrobacter sedlakii</i>				1		2%			
<i>Comomonas acidovorans</i>		1	1,9%				2		4%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	4	21,5%	2	1	4%	4	1	8%
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		1	1,9%	4		8%			
<i>Enterobacter cloacae</i>	22	18	58,8%	20	14	58%	20	18	56%
<i>Enterobacter sakazaki</i>				1	1	4%		1	2%
<i>Escherichia coli</i>	6	30	62,7%	5	32	66%	12	32	66%
<i>Escherichia hermannii</i>				1		2%	1		2%
<i>Hafnia alvei</i>	3	2	9,8%	8	4	20%		1	2%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	10	35,3%	8	14	36%	16	19	54%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	7	15,7%	1		2%	3	3	10%
<i>Kluyvera ascorbata</i>	3	3	9,8%	1	3	6%	1	1	4%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	2	1	5,9%	2	1	4%		1	2%
<i>Leclercia adecarboxylata</i>				1		2%			
<i>Pantoea agglomerans</i>	6	13	33,3%	16	12	44%	7	8	26%
<i>Proteus mirabilis</i>								1	2%
<i>Proteus vulgaris</i>		1	1,9%						
<i>Providencia retigeri</i>					1	2%			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4	7,8%	1	1	4%	3	3	12%
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>				1		2%			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>							2		4%
<i>Pseudomonas putida</i>	3	5	15,7%	2	3	8%	10	5	24%
<i>Raoutella ornithinolytica</i>		1	1,9%	1	1	4%			
<i>Raoutella terrigena</i>	4	5	13,7%	4	7	20%	6	11	28%
<i>Serratia marcescens</i>	10	6	25,5%	12	5	34%	3	2	10%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>							1		2%
Total de isolados	93	121		94	125		97	125	

RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; ReBio: Reserva Biológica.

Do total de isolados de *K. pneumoniae*, 81% apresentaram resistência ao sulfametoxazol/trimetropim. Um isolado (4,7%) foi resistente a cefoxitina e outro a cefalotina. Todas as cepas de *K. pneumoniae* foram sensíveis a florfenicol, tobramicina, gentamicina, enrofloxacina e ciprofloxacina. Um isolado obtido a partir de suabe anal de um mico-leão ocorrido em ReBio apresentou multirresistência a 6 antibióticos: amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol/trimetropim e cefalotina e um isolado de *K. pneumoniae* de sagui foi resistente a cefoxitina, cefalotina e sulfametoxazol/trimetropim.

Os isolados de *P. aeruginosa* foram sensíveis a 5 dos 6 antibióticos testados: amicacina, tobramicina, gentamicina, enrofloxacina e ciprofloxacina contudo, 53,8% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária a cefotaxima.

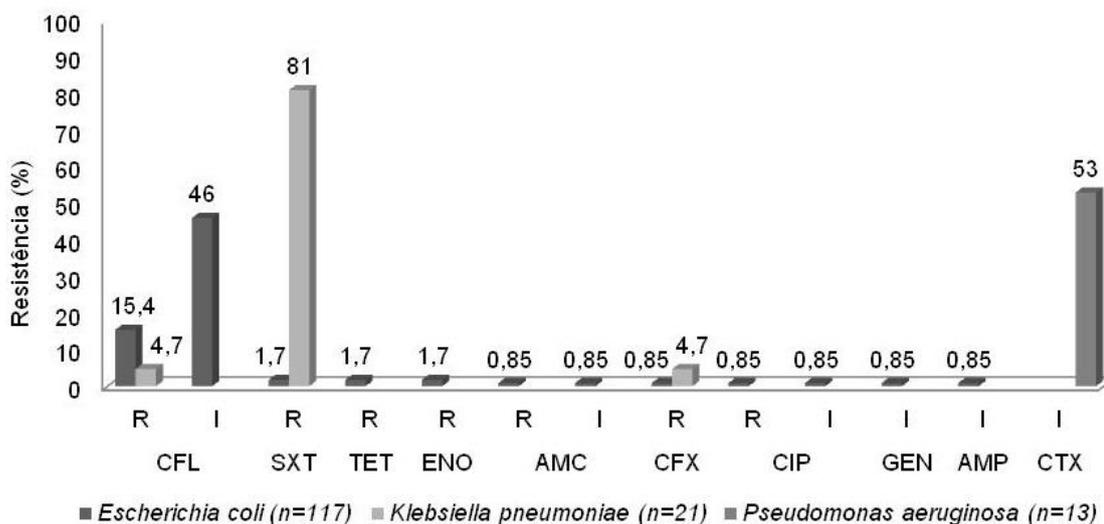


Figura 9: Resistências a antimicrobianos em bactérias gram-negativas isoladas das regiões oral e anal de híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) e micos-leões-dourados (*L. rosalia*) de vida livre. CFL: cefalotina, SXT: sulfametaxazol/trimetoprim, TET: tetraciclina, ENO: enrofloxacina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico, CFX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima.

6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) na ocorrência das bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* em micos-leões-dourados ocorridos em áreas com saguis (RPPN) e em micos-leões ocorridos em áreas sem saguis (Rebio). Também não houve diferença significativa na ocorrência de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. jejuni* em micos-leões ocorridos em RPPN e em saguis. Contudo, a ocorrência de *K.*

pneumoniae foi significativamente maior em micos-leões que habitam Rebio do que em micos-leões de RPPNs (tabela 4 e 5).

Tabela 4: Análise estatística da ocorrência de bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas em micos-leões-dourados que habitam Rebio e RPPN.

Bactéria	Número de animais colonizados		Qui-quadrado (χ^2)
	<i>L. rosalia</i> RPPN (n=50)	<i>L. rosalia</i> Rebio (n=51)	
<i>E. coli</i>	33	32	0,11 ^{ns}
<i>K. pneumoniae</i>	1	8	5,82*
<i>P. aeruginosa</i>	2	4	0,66 ^{ns}
<i>C. jejuni</i>	0	0	-

(ns) não significativo; (*) efeito significativo segundo o teste qui-quadrado ($P \leq 0,05$, GL= 1); RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; Rebio: Reserva biológica.

Tabela 5: Análise estatística da ocorrência de bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas em micos-leões-dourados e híbridos de saguis que habitam RPPN.

Bactéria	Número de animais colonizados		Qui-quadrado (χ^2)
	<i>L. rosalia</i> RPPN (n=50)	<i>Callithrix</i> sp. (n=50)	
<i>E. coli</i>	33	33	0
<i>K. pneumoniae</i>	1	5	2,84 ^{ns}
<i>P. aeruginosa</i>	2	6	2,17 ^{ns}
<i>C. jejuni</i>	0	1	1,01 ^{ns}

(ns) não significativo segundo o teste qui-quadrado ($P \leq 0,05$, GL= 1); RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional.

7. DISCUSSÃO

Enquanto as doenças de animais domésticos e de produção são bem conhecidas, em parte, devido ao fácil acesso desses animais pelos pesquisadores, a microbiologia dos animais selvagens é um campo relativamente emergente e grande parte dos animais estudados e conseqüentemente, das informações disponíveis, refere-se aos animais mantidos em cativeiro (TORTORA *et al.*, 2012).

Em levantamento bibliográfico realizado, pode-se constatar que grande parte das informações sobre a microbiota de PNH refere-se a estudos realizados com PNH do velho mundo mantidos em cativeiro e utilizados em pesquisas biomédicas. Apesar de o Brasil ser o país que possui a maior diversidade de espécies de PNH no mundo (COSTA *et al.*, 2005) pouco se sabe sobre a microbiota bacteriana dos PNH brasileiros (HOPKINS & NUNN, 2007).

No presente estudo, foram produzidas informações inéditas sobre a microbiota bacteriana de sagui e mico-leão-dourado ocorridos em vida livre, pois dos 17 gêneros de bactérias Gram-negativas identificados, não foram encontrados relatos da presença na microbiota dessas espécies de 8 gêneros (*Alcaligenes*, *Comomonas*, *Hafnia*, *Providencia*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Raoutella* e *Stenotrophomonas*). Uma hipótese que pode explicar a presença dessas bactérias na microbiota desses animais é a ocorrência das mesmas no meio ambiente o qual esses animais habitam, tendo em vista que algumas dessas bactérias podem ser encontradas no solo, na água e nas plantas (LOONEY *et al.*, 2009; MACDONALD *et al.*, 2014).

Macdonald *et al.* (2014) relatam que espécies de *Kluyvera* e *Raoutella* produzem enzimas que degradam polímeros como a celulose e a quitina, sendo que essas bactérias podem fazer parte da microbiota comensal de PNH onívoros ou serem adquiridas por eles através da dieta. Além disso, a composição da microbiota entérica de PNH também pode ser influenciada pelo tipo de dieta.

Brown *et al.* (1973), ao investigarem a microbiota oral de micos (*S. oedipus*) diante de diferentes tipos de dietas, concluíram que a composição da microbiota oral desses animais foi influenciada pelo tipo de dieta que os animais recebiam em cativeiro. Routman *et al.* (1985) chegaram a mesma conclusão ao estudarem a

estrutura populacional de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de babuínos amarelos africanos (*Papio cynocephalus*) de vida livre.

No presente trabalho, foram isoladas espécies consideradas comensais do trato gastrintestinal de PNH dos gêneros, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, na cavidade oral e anal de saguis e micos-leões corroborando com resultados de Verona (2009) que também relata a ocorrência dessas bactérias na cavidade oral e anal de saguis (*C. Jacchus*) ocorridos em vida livre no Rio de Janeiro e Loureiro *et al.* (1985), que encontraram essas bactérias em suabes retais de callitriquideos ocorridos na região da amazônica brasileira.

A ocorrência de enterobactérias fora do trato gastrintestinal também é relatada em PNH cativos. Smith *et al.* (2006) encontraram *Citrobacter* sp na vesícula biliar de micos-leões-dourados e saguis com colelitíase e Oriá *et al.* (2013) isolaram *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp. e *E. coli* na mucosa conjuntival de *C. jacchus* e *C. penicillata* clinicamente saudáveis. Em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) foram encontradas espécies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Proteus*, *Raoutella* e *Escherichia* na mucosa prepucial e vaginal de animais clinicamente saudáveis (DA SILVA *et al.*, 2013).

Cinco espécies de bactérias Gram-negativas foram encontradas somente nos híbridos de saguis: *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis* e *Stenotrophonas maltophilia*. Essas bactérias são consideradas patógenos oportunistas em humanos, portanto, o relato da ocorrência das mesmas nesses animais é extremamente relevante, pois é um consenso entre pesquisadores, que a introdução de espécies exóticas e invasoras está entre as principais ações com a capacidade de alterar drasticamente a qualidade de vida das espécies selvagens autóctones e a saúde humana, pois a introdução de uma espécie exótica pode levar a introdução acidental de espécies de patógenos a ela associadas (VERONA, 2009).

No homem, *A. baumannii* é encontrado principalmente em ambiente hospitalar causando infecções respiratórias, cutâneas e ocasionalmente, septicemias. Essa bactéria representa uma preocupação para a comunidade médica devido à rapidez com a qual adquire resistência aos antibióticos, sendo algumas linhagens resistentes a todos os antibióticos disponíveis (TORTORA *et al.*, 2012). Em PNH foi encontrado um relato de isolamento de *A. baumannii* em lêmures (*Lemur catta*) selvagens clinicamente saudáveis (VILLERS *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Proteus* são normalmente encontradas no trato gastrointestinal de PNH selvagens e cativos (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009) e de humanos, contudo fora do seu ambiente natural de ocorrência, essa bactéria pode causar infecções em feridas e no trato urinário em humanos (TORTORA *et al.*, 2012). A *P. fluorescens* pode ocasionar septicemias em pacientes humanos hospitalizados imunocomprometidos (HSUEH *et al.*, 1998). Foram encontrados relatos da presença de *P. fluorescens* na microbiota de macaco rhesus (*M. mullata*) (VORE *et al.*, 2001), saguis (*Saguinus fuscicollis*) (NORDSTROM *et al.*, 1989) e lêmures- *Lemur catta* (VILLERS *et al.*, 2008).

S. maltophilia e *A. denitrificans* também são considerados importantes patógenos oportunistas, responsáveis por infecções nosocomiais em humanos (AISENBERG *et al.*, 2004; LOONEY *et al.*, 2009). Em PNH, *Alcaligenes* spp. foram encontradas na cavidade oral de micos (*S. oedipus*) saudáveis (BROWN *et al.*, 1973) e em amostras da conjuntiva de saguis (*Callithrix* spp.) e macacos-pregos (*Cebus* sp.) saudáveis mantidos em cativeiro (ORIÁ *et al.*, 2013). Até o momento, não foram encontrados relatos de isolamento de *S. maltophilia* em PNH.

Não foram encontradas espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*, nos animais avaliados. Verona (2009) também não isolou esses enteropatógenos em amostras de saguis *C. jacchus* advindos de vida livre, entretanto em amostras de saguis mantidos em cativeiro o autor isolou *Salmonella* Newlands.

Dentre as principais bactérias Gram-negativas consideradas como potenciais causadores de doenças em callitriquídeos, quatro bactérias foram isoladas sendo que três dessas, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram encontradas colonizando saguis e micos-leões-dourados e uma bactéria, *Campylobacter jejuni*, foi isolada apenas em sagui.

Verona (2009) não encontrou *Campylobacter* spp. em saguis ocorridos em vida livre no Rio de Janeiro mas, isolou em amostras de saguis oriundos de cativeiro. O autor também relata a ocorrência de *K. pneumoniae* em *C. jacchus*, de vida livre aparentemente saudáveis, entretanto, septicemia, peritonite e colite devido à infecção por *K. pneumoniae* são relatadas em *C. jacchus* mantido em cativeiro (PISHARATH *et al.*, 2005; DAVID *et al.*, 2009). Ludlage e Mansfield (2003) destacam que *Campylobacter* spp. e *K. pneumoniae* são importantes patógenos em *C. jacchus* cativos, sendo essas bactérias comumente encontradas nesses animais sob essa condição.

Foram encontrados relatos de *P. aeruginosa* isolada a partir de amostras coletadas durante exames *post-mortem* realizados em callitriquídeos de vida livre e de cativeiro que apresentavam lesões morfológicas compatíveis com hepatite, colite e pneumonia (COUTINHO *et al.*, 2007; DAVID *et al.*, 2009). Por outro lado, pneumonia, colite e necrose na mucosa do íleo e cólon foram achados *post-mortem* presentes em exemplares de *C. jacchus* infectados com *E. coli* (POTKAY, 1992; DAVID *et al.*, 2009). Em micos-leões-dourados foi encontrado relato da presença de *E. coli* em abscesso na cavidade oral (MCBRIDE *et al.*, 2010).

Não foram encontradas diferenças significativas ($P \leq 0,05$, GL 1) na ocorrência das espécies de importância médica isoladas em micos-leões que convivem junto com os invasores quando comparados com micos-leões que não convivem com esses animais e, embora a frequência relativa de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *C. jejuni* tenha sido maior em saguis do que nos micos-leões que convivem com os invasores, essas diferenças também não foram significativas.

Entretanto, é importante considerar que, o adensamento populacional devido à constante supressão do habitat associado à competição por recursos como alimentos entre saguis e micos-leões são condições que geram um risco constante de transmissão desses potenciais patógenos entre a espécie nativa e a espécie invasora.

No presente trabalho, todos os isolados de *P. aeruginosa* foram sensíveis aos antibióticos testados, porém 53,8% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária a cefotaxima. Da mesma forma, a maioria dos isolados de *E. coli* foi sensível aos 11 antibióticos testados entretanto, a cefalotina, foi o antimicrobiano menos eficiente, pois 15,4% dos isolados foram resistentes e 46,15% apresentaram susceptibilidade intermediária. Uma cepa de *E. coli* obtida de um mico-leão-dourado de RPPN apresentou multirresistência a 4 antibióticos: cefalotina, cefoxitina, ampicilina e amoxicilina/ ácido clavulânico.

Nossos resultados corroboram com os achados de Martin *et al.* (2009), que também relatam uma elevada resistência a cefalotina em cepas de *E. coli* isoladas de macacos rhesus saudáveis mantidos em cativeiro. A ocorrência de *E. coli* multirresistentes também é relatada nesse trabalho. A cefalotina também foi o antibiótico menos eficiente contra bactérias Gram-negativas isoladas da mucosa vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) cativos (DA SILVA *et al.*, 2013). Entretanto, não foram encontrados relatos de resistências significativas

a cefalotina em *E. coli* isoladas de PNH em vida livre (ROUTMAN *et al.*, 1985; RWEGO *et al.*, 2008).

Não houve uma correlação entre a ocorrência de *E. coli* resistentes a antimicrobianos e a presença dos invasores, pois a quantidade de isolados de *E. coli* resistentes a cefalotina foi a mesma em saguis, micos-leões de Rebio e micos-leões de RPPN, não tendo sido encontradas *E. coli* multirresistentes nos invasores.

Todas as cepas de *K. pneumoniae* isoladas foram sensíveis a florfenicol, tobramicina, gentamicina, enrofloxacina e ciprofloxacina porém, 81% dos isolados foram resistentes ao sulfametoxazol/trimetropim. Um isolado de *K. pneumoniae* obtido de um mico-leão que habita Rebio apresentou multirresistência a 6 antibióticos: amoxicilina com ácido clavulânico, cefoxitina, tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol/trimetropim e cefalotina e um isolado de *K. pneumoniae* de sagui foi resistente a cefoxitina, cefalotina e sulfametoxazol/trimetropim.

Verona (2009) também relata a resistência a cefoxitina e a cefalotina em *K. pneumoniae* obtidos de *C. jacchus* selvagens sadios. Em cativeiro é relatada a resistência a ampicilina em *K. pneumoniae* isolada de exudato peritoneal e vísceras de *C. jacchus* com peritonite e septicemia, e isolada de abscesso retroperitoneal de macaco de cheiro (*S. sciureus*) que teve morte súbita (PISHARATH *et al.*, 2005; CHIKWETO *et al.*, 2013).

A veiculação de antimicrobianos e/ou bactérias resistentes a antibióticos através da água e o contato com restos de alimentos e outros detritos humanos contaminados com esse tipo de microrganismo e/ou antibióticos, propiciam a contaminação de animais selvagens por bactérias resistentes ou o desenvolvimento de bactérias resistentes nesses animais, principalmente em ambientes naturais modificados (ROLLAND *et al.*, 1985; VERONA, 2009; ALLEN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014), como as RPPNs, que estão localizadas dentro de fazendas que possuem criações de animais de produção, atividade esta, que favorece a contaminação ambiental com bactérias resistentes e/ou resíduos de antibióticos.

Cabe ainda ressaltar, que os animais que participaram do presente estudo vêm sendo capturados há vários anos para o monitoramento dos grupos e coleta de amostras biológicas para a realização de pesquisas científicas, o que também pode favorecer o contato desses animais com bactérias resistentes eventualmente presentes nas armadilhas usadas para as capturas, nas bananas utilizadas como iscas nas capturas e nos pesquisadores que manipularam esses animais.

8. CONCLUSÃO

- Micos-leões-dourados e híbridos de saguis em vida livre apresentam uma ampla diversidade de bactérias entéricas Gram-negativas;
- Bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas ocorrem em micos-leões-dourados que convivem e que não convivem com híbridos de saguis e também nos invasores;
- *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram encontradas em ambas as espécies, porém *Campylobacter jejuni*, foi isolada apenas na espécie invasora. Não foram encontradas diferenças significativas na ocorrência dessas bactérias em grupos de micos-leões que habitam áreas com a presença dos invasores quando comparado com os grupos de micos-leões que habitam áreas sem a presença dos invasores;
- A maioria dos isolados das espécies bacterianas potencialmente patogênicas foi sensível aos antibióticos testados, porém a cefalotina e o sulfametoxazol/trimetropim foram os antimicrobianos que apresentaram menor potencial inibidor para *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Estudos moleculares são necessários para elucidar as resistências aos antimicrobianos encontradas.

9. REFERÊNCIAS

ALLEN, S. E.; BOERLIN, P.; JANECKO, N.; LUMSDEN, J. S.; BARKER, I. K.; PEARL, D.L.; ... & JARDINE, C. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. **Applied and environmental microbiology**, v.77, n.3, 882-888, 2011.

ANDRADE, M.C.R.; GABEIRA, S.C.D.O.; ABREU-LOPES, D.; ESTEVES, W.T.C.; VILARDO, M.D.C.B.; THOMÉ, J.S.D.; CABELLO, P.H.; LAURIA-FILGUEIRAS, A.L. Circulation of *Campylobacter* spp. in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) held in captivity: a longitudinal study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.53-57, 2007.

ANDRADE, M.C.R.; LOPES, D.A.; GABEIRA, S.C.O.; ESTEVES, W.T.C.; VILARDO, M.C.B.; THOMÉ, J.D.S.; LAURIA-FILGUEIRAS, A.L. Presença de *Campylobacter* spp. em macacos-de-cheiro (*Saimiri* spp.) assintomáticos cativos e sua correlação com as condições de manejo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** [online]. v. 61, n.4, p. 890-895, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004. 1. ed. Editora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Brasil, p. 356-381.

ARDASHELIYA, S. N.; KALASHNIKOVA, V. A.; DZHIKIDZE, E. K. Etiologic structure of bacterial intestinal infections in monkeys of Adler Breeding Center. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.151, n.6, p. 734-37, 2011.

ARYA, S.C.; VERGHESE, A.; AGARWAL, D.S.; PAL, S.C. Shigellosis in rhesus monkeys in quarantine. **Laboratory animals**, v.7, n.2, p.101-109, 1973.

BAGGS, R. B.; HUNT, R. D.; GARCIA, F. G.; HAJEMA, E. M.; BLAKE, B. J.; FRASER, C.E.O. Pseudotuberculosis (*Yersinia enterocolitica*) in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Laboratory Animal Science**, n.26, p.1079-1083, 1976.

BICCA-MARQUES, J.C.; SILVA, V.M.; GOMES, D.F. Ordem Primates. In: REIS, N.L.; PERACCHI, A.L.; WAGNER, P. A.; LIMA, P.I (Eds). **Mamíferos do Brasil**, Londrina: Edifurb, 2006, p.101-148.

BIELLI, M.; LAUZI, S.; PRATELLI, A.; MARTINI, M.; DALL'ARA, P.; BONIZZI L. Pseudotuberculosis in marmosets, tamarins, and goeldi's monkeys (callithrichidae/callimiconidae) housed at a european zoo. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n.4, p. 532-536, 1999.

BONCYK, L.H.; BRACK, M.; KALTER, S.S. Hemorrhagic-necrotic enteritis in a baboon (*Papio cynocephalus*) due to vibrio fetus. **Laboratory Animal Science**, n.22, p.734-738, 1972.

BUHLES, W.C.J.; VANDERLIP, J.E.; RUSSELL, S.W.; ALEXANDER, N. L. *Yersinia pseudotuberculosis* Infection: Study of an epizootic in Squirrel Monkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, Mar. p.519-525, 1981.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Brasília, 60 p. (série A. Normas e manuais técnicos).

BRONSON, R.T.; MAY, B.D.; RUEBNER, B.H. An outbreak of infection by *Yersinia pseudotuberculosis* in nonhuman primates. **American Journal of Pathology**, n.69, p.289-303, 1972.

BROWN, L.R.; HANDLER, S.; ALLEN, S.S.; SHEA, C.; WHEATCROFT, M.G.; FROME, W.J. Oral microbial profile of the marmoset. **Journal of Dental Research**, v.52, n.4, p.815-822, 1973.

BRUNO, S.F. & BARD, V.T. **Exóticos Invasores: Bioinvasores selvagens introduzidos no estado do Rio de Janeiro e suas implicações.** Rio de Janeiro, 1. ed., Editora da Universidade Federal Fluminense, 2012, 127p.

BRYANT, J.L.; STILLS, H.F.; LENTSCH, R.H.; MIDDLETON, C.C. *Campylobacter jejuni* isolated from patas monkeys with diarrhea. **Laboratory Animal Science**, n.33, p. 303-305, 1983.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C.L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; ... & DE CASTRO, A.F.P. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1225-1234, 2003.

CHIKWETO, A.; HARIHARAN, H.; BHAIYAT, M. I.; KUMTHEKAR, S.M.; TIWARI, K. P.; DRAGON, L.; SHARMA, R.N. *Klebsiella pneumoniae* Infection in a Squirrel Monkey (*Saimiri Sciureus*) in Grenada, West Indies. **International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports**, 2013. Article ID 264913, DOI: 10.5171/2013.264913.

COOPER, J.E. & NEEDHAM, J.R. An outbreak of shigellosis in laboratory marmosets and tamarins (Family: Callithricidae). **Journal of Hygiene (Cambridge)**, v.3, n.76, p.415-424, 1976.

COSTA, G.A.; HOFER, E. 1972. **Isolamento e identificação de enterobactérias.** Monografia. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, 120 p.

COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; MENDES, S.L.; DITCHFIELD, A.D. Mammal Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, n.19, p.672-679, 2005.

COUTINHO, J.F.V.; ARACI, D.; LIRNA, A.M.T. SILVA, M.S.B.F.; BONFIM, W.M.; BARROS, V.L.R.S.; DA COSTA, P.F. Investigação etiológica de uma epizootia em saguis (*Callithrix jacchus*) numa área indene para febre amarela.. **A Primatologia no Brasil**, v. 10, p.26-268, 2007.

CUBAS, Z.S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. **Revue Scientifique et Technique-Office International des épizooties**, v. 15, n.1, p.267-288, 1996.

DA SILVA, G.A.; MONTEIRO, F.O.B.; DIAS, H.L.T.; CAVALCANTE, R.D.O.; SAMPAIO, A.D.F.; DA CONCEIÇÃO, M.E.B.A.M.; ... & RAHAL, S.C. Qualitative analysis of preputial and vaginal bacterial microbiota in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) raised in captivity. **Journal of Medical Primatology**, v.42, n.2, p.71-78, 2013.

DAVID, J.M.; DICK JR., E.J.; GENE, E.; HUBBARD, B. Spontaneous pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and tamarins (*Saguinus oedipus*, *Saguinus mystax*). **Journal of Medical Primatology**, v.38, n.5, p.347–359, 2009.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; NAGLIC, T.; TURK, N.; ŠEOL, B.; GRABAREVIĆ, Ž.; BATA, I.; ... & STOLLE, A.. Yersiniosis in zoo marmosets (*Callithrix jacchus*) caused by *Yersinia enterocolitica* 4/O:3. **Veterinary Microbiology**, v.121, n.3, p.363-367, 2007.

GILLESPIE, T.R. & CHAPMAN, C.A. Prediction of Parasite Infection Dynamics in Primate Metapopulations Based on Attributes of Forest Fragmentation. **Conservation Biology**, n.20, p. 441-448, 2006.

GOOD, R.C.; MAY, B.D.; KAWATOMARI, T. Enteric Pathogens in Monkeys. **Journal of Bacteriology**, v.97, n.3, p.1048-1055, 1969.

GRIFFITH, M.; STIRLING, J.; BLAIR, I.; CORMICAN, M.; DOOLEY, J.S.; GOLDSMITH, C.E.; GLOVER S.G.; LOUGHREY, A.; LOWERY, C.J.; MATSUDA, M.; MCCLURG, R.; MCCORRY, K.; MCDOWELL D.; ... MOORE, J.E. Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. **Zoonoses Public Health**, n.55, p.166-172, 2008.

HABERMAN, R.T.; WILLIAMS, F.T. Diseases seen at necropsy of 708 *Macaca mulatta* (rhesus monkeys) and *Macaca philippinesis* (cynomolgus monkey). **American Journal of Veterinary Research** n.18, p. 419-426, 1957.

HARMON, K.M.; RAMSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Mol Cell Probes**, n.11, p. 195-200, 1997.

HERRON-OLSON, L.; FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J.M.; KAPUR, V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One** 2(10):e1120, 2007.

HIRD, D.W.; ANDERSON, J.H.; BIELITZKI, J.T. Diarrhea in nonhuman primates: A survey of primate colonies for incidence rates and clinical opinion. **Laboratory Animal Science**, n. 34, p.465-470, 1984.

HOLMBERG, C. A.; LEININGER, R.; WHEELDON, E.; SLATER, D.; HENRICKSON, R.; ANDERSON, J. Clinicopathological studies of gastrointestinal disease in macaques. **Veterinary Pathology Online**, n.19 (7 suppl), p.163-170, 1982.

HOPKINS, M.E.; NUNN, C.L.A. Global gap analysis of infectious agents in wild primates. **Diversity and Distributions**, n.13, p. 561–572, 2007. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00364.x

HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; PAN, H.J.; CHEN, Y.C.; SUN, C.C.; HO, S.W.; LUH, K.T. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p. 2914-2917, 1998.

IUCN, 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version: 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Download em: **03 February 2015**.

KALASHNIKOVA, V. A.; DZHIKIDZE, E. K.; STASILEVICH, Z. K.; CHIKOBAVA, M.G. Detection of *Campylobacter jejuni* in healthy monkeys and monkeys with enteric infections by PCR. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.134, n.3, p. 299-300, 2002.

KINDLOVITS, A. & KINDLOVITS, L.M. Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais. Rio de Janeiro, 2. ed., L.F. Livros, 2009, 535 p.

KLOOS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Reviews in Microbiology**, v.34, n.1, p. 559-592, 1980.

KNÖBL, T.; ROCHA, L.T.; MENÃO, M.C.; IGAYARA, C.A.S.; PAIXÃO, R.; MORENO, A.M. Salmonella Yoruba infection in white-tufted-ear marmoset (*Callithrix jacchus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.8, p.707-710, 2011.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro. Rio de Janeiro, 2000. Tese. (Doutorado em Biologia Parasitária), Fundação Oswaldo Cruz, 82f.

LEONG, K. M.; TERRELL, S.P.; SAVAGE, A. Causes of mortality in captive cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). **Zoo Biology**, v.23, n.2, p.127-137, 2004.

LOONEY, W.J.; NARITA, M. MÜHLEMANN, K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. **Lancet Infect Dis**, v.9, p.312-323, 2009.

LOUREIRO, E. C. B.; MUNIZ, J. A. P. C.; KINGSTON, W. R. Enterobactérias detectadas em primatas capturados na região amazônica do Brasil. **Rev. Fund. SESP**, v.30, n.2, p.121-126, 1985.

LOWDER, B.V.; GUINANEIA, C.M.; BEN ZAKOUR, N.L.; WEINERT, L.A.; CONWAY-MORRIS, A.; CARTWRIGHT, R.A.; SIMPSON, A.J.; RAMBAUT, A.; NÜBELD, U.; FITZGERALD, J.R. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, n.46, p.19545-19550, 2009.

LUDLAGE, E. & MANSFIELD, K.G. Clinical care and diseases of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v.53, n.4, p.369-382, 2003.

MANSFIELD, K. G.; LIN, K.C.; XIA, D.; NEWMAN, J.V.; SCHAUER, D.B.; MACKEY, J., ... & CARVILLE, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* and ulcerative colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). **Journal of Infectious Diseases**, v.184, n.6, p. 803-807, 2001.

MARTIN, H.R.; TAYLOR, N.S.; BUCKLEY, E.M.; MARINI, R.P.; PATTERSON, M.M.; FOX, J.G. Characterization of cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* strains from faeces of healthy macaques. **Journal of Medical Microbiology**, n. 58, p.1354-1358, 2009.

MCBRIDE, M.; CULLION, C. Successful treatment of a chronic facial abscess using a prolonged release antibiotic copolymer in a golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.41, n.2, p.316-319, 2010.

MCCLURE, H. M.; WEAVER, R. E.; KAUFMAN, A.F. Pseudotuberculosis in nonhuman primates: infection with organisms of the *Yersinia enterocolitica* group. **Laboratory Animal Science**, n.21, p.376-382, 1971.

MACDONALD, C.; BARDEN, S.; FOLEY, S. Isolation and characterization of chitin-degrading micro-organisms from the faeces of Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). **Journal of applied microbiology**, v.116, n.1, p.52-59, 2014.

MENEZES-COSTA, A.; MACHADO-FERREIRA, E.; VOLOCH, C.M.; BONVICINO, C.R.; SEUÁNEZ, H.N.; LEONCINI, O.; SOARES, C.A.G. Identification of Bacterial Infection in Neotropical Primates. **Microbiology Ecology**, n.66, p. 471-478, 2013.

MOORE, R. 1985. Nonviral Infectious Agents and Marmoset (*Saguinus oedipus*) Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 30, n.12, (Supplement), pp. 69S-71S, 1985.

MORAIS JR., M.M.; RUIZ MIRANDA, C.R.; GRAVITOL, A.D.; ANDRADE, C.C.; LIMA, C.S.; MARTINS, A.; BECK, B.B. Os saguis, *Callithrix Jacchus* e *C. penicillata*, como espécies invasoras na região do mico-leão-dourado. In: Oliveira, P.P.; Gravitól, A.D.; Ruiz Miranda, C.R. (Eds.), **Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. Campos dos Goytacazes, 1. ed., Editora da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008, p. 86-117.

MORTON, W.R.; KULLER, L.; KNITTER, G. Incidence of *Campylobacter fetus* ss. *jejuni* enteritis in a nonhuman primate nursery. **32nd Annual Meeting American Association of Laboratory Animal Scientists**, abstract n. 47, 1981.

MUGISHA, L.; KÖNDGEN, S.; KADDU-MULINDWA, D.; GAFFIKIN, L.; LEENDERTZ, F.H. Nasopharyngeal colonization by potentially pathogenic bacteria found in healthy semi-captive wild-born chimpanzees in Uganda. **American Journal of Primatology**, v.76, n.2, p.103-110, 2014.

NORDSTROM, K. M.; BELCHER, A.M.; EPPLE, G.; GREENFIELD, K. L.; LEYDEN, J. J.; SMITH, A. B. Skin surface microflora of the saddle-back tamarin monkey (*Saguinus fuscicollis*). **Journal of chemical ecology**, v.15, n.2, p.629-639, 1989.

OKWORI, A.E.J.; OFILI A.I.; UZOECHINA, A.R.; NWANKITI, O.; CHOLLOM, S.C.; ECHEONWU, G.O.N.; ADIKWU, T.I. Spectrum of Bacterial Isolates from Captive Non-Human Primates in Jos Wild Life Park. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.3, n.4, p.30-34, 2013.

OLIVEIRA, M.E.A.; NASCIMENTO, M.T.; CARVALHO, F.A.; VILLELA, D.; KIERULFF, M.C.M.; VERULI, V.P.; LAPENTA, M.J.; SILVA, A.P. Qualidade do habitat na área de ocorrência do mico-leão-dourado. In: Oliveira, P.P.; Grativol, A.D.; Ruiz Miranda, C.R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. Campos dos Goytacazes, 1. ed, Editora da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008, p. 14-39.

ORIÁ, A.P.; PINNA, M.H.; ALMEIDA, D.S.; DA SILVA, R.M.M.; PINHEIRO, A.C.O.; SANTANA, F.O. COSTA, T.R.I.; MENESES, D.S.; MARTINS FILHO, E.F.; OLIVEIRA, A.V.D. Conjunctival flora, Schirmer's tear test, intraocular pressure, and conjunctival cytology in neotropical primates from Salvador, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, n.42, p.287-292, 2013.

PAIXÃO, T. A.; MALTA, M.C.; SOAVE, S.A.; TINOCO, H.P.; COSTA, M.E.; PESSANHA, A.T.; ... & SANTOS, R.L. Hemorrhagic colitis associated with Salmonella enterica serotype Infantis infection in a captive western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) in Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v.43, n.2, p.118-121, 2014.

PALUMBO, N. & PERRI, S. Some observations on shigellosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **The Journal of Zoo Animal Medicine**, v.3, n.1, p. 21-26, 1972.

PAZZAGLIA, G.; WIDJAJA, S.; SOEBEKTI, D.; TJANIADI, P.; SIMANJUNTAK, L.; LESMANA, M.; JENNINGS, G. Persistent, recurring diarrhea in a colony of orangutans (*Pongo pygmaeus*) caused by multiple strains of *Campylobacter* spp. **Acta Tropica**, n.57, p.1-10, 1994.

PEREIRA, D.G.; OLIVEIRA, M.E.A.; RUIZ-MIRANDA, C.R. Interações entre calitriquídeos exóticos e nativos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos - RJ. **Espaço & Geografia**, n.11, p.87-114, 2008.

PETRZĚLKOVA', K.J.; HASEGAWA, H.; APPLETON, C.C.; HUFFMAN, M.A.; ARCHER, C.E.; MOSCOVICE, L.R.; MAPUA, M.I.; SINGH, J.; KAUR, T. Gastrointestinal Parasites of the Chimpanzee Population Introduced on to Rubondo Island National Park, Tanzânia. **American Journal of Primatology**, n.72, p.307-316, 2010.

PISHARATH, H.R.; COOPER, T.K.; BRICE, A.K.; CIANCIOLO, R.E.; PISTORIO, A.L.; WACHTMAN, L.M.; ... & NEWCOMER, C.E. Septicemia and peritonitis in a colony of common marmosets (*Callithrix jacchus*) secondary to *Klebsiella pneumoniae* infection. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.44, n.1, p.35-37, 2005.

PISSINATTI, A.; MONTALI, R.J.; SIMON, F. Doenças em micos-leões. In: Kleiman, D.G. & Rylands, A.B., (Eds), **Micos-leões: Biologia e Conservação**, Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2008, p.340-358.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, n.4, p.151-156, 1989.

POTKAY, S. Diseases of the Callitrichidae: a review. **Journal of Medical Primatology**, v.21, n.4, p.189-236, 1992.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in microbiology**, v.5. doi:10.3389/fmicb.2014.00023, 2014.

ROLLAND, R. M.; HAUSFATER, G.; MARSHALL, B.; LEVY, S.B. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. **Applied and environmental microbiology**, v.49, n.4, p.791-794, 1985.

ROUTMAN, E.R.I.C.; MILLER, R.D.; PHILLIPS-CONROY, J.A.N.E.; HARTL, D.L. Antibiotic resistance and population structure in *Escherichia coli* from free-ranging African yellow baboons. **Applied and environmental microbiology**, v.50, n.4, p.749-754, 1985.

RUIZ-MIRANDA, C. R.; AFFONSO, A. G.; MORAIS, M. M.; VERONA, C. E.; MARTINS, A.; BECK, B. Behavioral and ecological interactions between reintroduced golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and introduced marmosets (*Callithrix* spp. Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest fragments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.1, p.99-109, 2006.

RUIZ-MIRANDA, C.R.; GRATIVOL, A.D.; OLIVEIRA, P.P. A espécie e sua situação na paisagem fragmentada. In: Oliveira, P.P.; Grativol, A.D.; Ruiz Miranda, C.R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. Campos dos Goytacazes, 1. ed, Editora da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008, p. 6-13.

RYLANDS, A.B.; MALLINSON, J.J.C.; KLEIMAN, D.G.; COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A.; CÂMARA, I. G.; VALLADARES-PADUA, C.B.; BAMPI, M.I.

História da Pesquisa e Conservação do Mico-leão. In: Kleiman, D.G. & Rylands, A.B., (Eds). **Micos-leões: Biologia e Conservação**, 1. ed., Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2008, p. 23-68.

RWEGO, I. B.; ISABIRYE-BASUTA, G.; GILLESPIE, T. R.; GOLDBERG, T. L. Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. **Conservation Biology**, v.22, n.6, p.1600-1607, 2008.

SÁNCHEZ, N.; GÁLVEZ, H.; MONTOYA, E.; GOZALO, A. Mortalidad en crías de *Aotus* sp. (primates: cebidae) em cautiverio: una limitante para estudios bio médicos com modelos animales. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v.23, n.3, p.221-224, 2006.

SAUER, R.M. & FEGLEY, H.C. The role of infectious and noninfectious diseases in monkeys health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.85, p. 867-888, 1960.

SCHNEIDER, N. J.; PRATHER, E.C.; LEWIS, A.L.; SCATTERDAY, J.E.; HARDY, A.V. Enteric bacteriological studies in a large colony of primates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.85 p. 935–941, 1960.

SESTAK, K.; MERRITT, C.K.; BORDA, J.; SAYLOR, E.; SCHWAMBERGER, S.R.; COGSWELL, F.; DIDIER, E.S.; DIDIER, P.J.; PLAUCHE, G.; BOHM, R.P.; AYE, P.P.; ALEXA, P.; WARD, R.L.; LACKNER, A.A. Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques. **Infection and Immunity**, v.71, n.7, p.4079-4086, 2003.

SMITH, K.M.; CALLE, P.; RAPHAEL, B.L.; JAMES, S.; MOORE, R.; MCALOOSE, D.; BAITCHMAN, E. Cholelithiasis in four callitrichid species (*Leontopithecus*, *Callithrix*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, n.1, p.44-48, 2006.

SMITH, K.F.; WHITEHOUSE, K.A.; PEDERSEN, A.B. The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal Conservation**, n.12, Print ISSN 1367-9430, 2008.

SOTO, E.; LAMON, V.; GRIFFIN, M.; KEIRSTEAD, N.; BEIERSCHMITT, A.; PALMOUR, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered from nonhuman primates. **Journal of Wildlife Diseases**, v.48, n.3, p.603-611, 2012.

SOTO, E.; GRIFFIN, M.; VERMA, A.; CASTILLO-ALCALA, F.; BEIERSCHMITT, A.; BEELER-MARFISI, J.; ARAUZ, M.; ILLANES, O. An Outbreak of *Yersinia enterocolitica* in a captive colony of african green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaesus*) in the Caribbean. **Comparative Medicine**, v.63, n.5, p.439-444, 2013.

SOUSA, M.; GONÇALVES, A.; SILVA, N.; SERRA, R.; ALCAIDE, R.; ZORRILLA, I.; TORRES, C.; CANIÇA, M.; IGREJAS, G.; POETA, P. Acquired antibiotic resistance among wild animals: the case of Iberian Lynx (*Lynx pardinus*), **Veterinary Quarterly**, v.34, n.2, p.105-112, 2014. DOI: 10.1080/01652176.2014.949391.

STEYN, D.G.; FINLAYSON, M.H.; BREDE, H.D. The *Enterobacteriaceae* of South African Baboons. **South African Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, n.50, p. 994-996, 1976.

STIRLING, J.; GRIFFITH, M.; BLAIR, I.; CORMICAN, M.; DOOLEY, J.S.G.; GOLDSMITH, C.E.; ... & MOORE, J.E. Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. **Zoonoses and Public Health**, v.55, n.3, p.166-172, 2008.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre, 10. ed. Artmed, 2012, 877p.

TRAAD, R.M.; LEITE, J.C.M.; WECKERLIN, P.; TRINDADE, S. Introdução das espécies exóticas *Callithrix penicillata* (geoffroy, 1812) e *Callithrix jacchus* (linnaeus, 1758) em ambientes urbanos (Primates: Callithrichidae). **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v.2, n.1, p. 9-23, 2012.

TRIBE, G.W. & FRANK, A. Campylobacter in monkeys. **Veterinary Records**, n.106, p.365-366, 1980.

TRIBE, G.W. & FLEMING, M. P. Biphasic enteritis in imported cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys infected with Shigella, Salmonella and Campylobacter species. **Laboratory animals**, v.17, n.1, p. 65-69, 1983.

TWENHAFEL, N. A.; WHITEHOUSE, C. A.; STEVENS, E.L.; HOTTEL, H.E.; FOSTER, C.D.; GAMBLE, S.; ABBOTT, S.; JANDA, J. M.; KREISELMEIER, N.; STEELE, K.E. Multisystemic Abscesses in African Green Monkeys (*Chlorocebus aethiops*) with Invasive *Klebsiella pneumoniae*: Identification of the Hypermucoviscosity Phenotype. **Veterinary Pathology**, n.45, p.226-231, 2008.

VELA, A.L.; GUTIERREZ, M.C.; FALSEN, E.; ROLLAN, E.; SIMARRO, I.; GARCIA, P.; DOMINGUEZ, L.; VENTOSA, A.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F. *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.11, p.2671-2676, 2006.

VILLERS, L.M.; JANG, S.S.; LENT, C.L.; LEWIN-KOH, S.C.; NOROSOARINAIVO, J.A. Survey and comparison of major intestinal flora in captive and wild ring-tailed lemur (*Lemur catta*) populations. **American Journal of Primatology**, v.70, n.2, p.175-184, 2008.

VINCZE, S.; STAMM, I.; MONECKE, S.; KOPP, P.A.; SEMMLER, T.; WIELER, L.H.; LÜBKE-BECKER, A.; WALTHER, B. Molecular analysis of human and canine *Staphylococcus aureus* strains reveals distinct extended-host-spectrum genotypes independent of their methicillin resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.2, p. 655-662, 2013.

VERONA, C.E.S. Parasitos em sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) no Rio de Janeiro. 2009. 116f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz,

Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Rio de Janeiro, 2009.

VORE, S.J.; PEELE, P.D.; BARROW, P.A.; BRADFIELD, J.F.; PRYOR, W.H.J. A prevalence survey for zoonotic enteric bacteria in a research monkey colony with specific emphasis on the occurrence of enteric *Yersinia*. **Journal of Medical Primatology**, n.30, p.20-25, 2001.

WHITEHOUSE, C.A.; KEIRSTEAD, N.; TAYLOR, J.; REINHARDT, J.L.; BEIERSCHMITT, A. Prevalence of Hyper Muroid *Klebsiella Pneumoniae* among Wild-Caught and Captive Vervet Monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) on the Island of St. Kitts. **Journal of Wildlife Diseases**, n.46, p.971-976, 2010.

WHITTIER, C.A.; CRANFIELD, M.R.; STOSKOPF, M.K. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp. in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.46, n.3, p.791-802, 2010.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COLETADOS DE PRIMATAS
NÃO HUMANOS DE VIDA LIVRE (*Callithrix* spp. e *Leontopithecus
rosalia*) COMO RESERVATÓRIOS DE GENES DE VIRULÊNCIA E DE
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTAFILOCOCOS EM PNH

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e é composto por 36 espécies e 21 subespécies (PANTŮČEK *et al.*, 2005). São bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, esféricas, catalase positivas, oxidase negativas (a maioria das espécies), fermentadoras de açúcares, podem ser hemolíticas ou não e toleram concentrações aumentadas de sal. De acordo com a capacidade de coagulação do plasma sanguíneo, os estafilococos são divididos em duas categorias: estafilococos coagulase positivos e coagulase negativos - CoNS (ANVISA, 2004).

Várias espécies de estafilococos são comensais da pele e das membranas mucosas de humanos e animais, sendo que algumas espécies são encontradas em humanos e PNH, como *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. aureus* (KLOOS, 1980). O *S. aureus*, é considerado um importante patógeno humano e veterinário, pois essa espécie é responsável por uma ampla variedade de doenças e possui linhagens que desenvolveram vários mecanismos de virulência e de resistências a antimicrobianos como os *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) e a vancomicina - VRSA (SUZUKI *et al.*, 2012; NAGEL *et al.*, 2013).

No homem, o *S. aureus* pode causar desde infecções cutâneas como espinhas e furúnculos a pneumonias, intoxicações alimentares e infecções em feridas cirúrgicas, sendo também um importante causador de infecções nosocomiais caracterizadas por alto índice de mortalidade dos pacientes, devido à produção de fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos (TORTORA, 2012).

Vários fatores de virulência, como hemolisinas, exfoliatinas, leucocidinas, enterotoxinas e toxinas pirogênicas, são responsáveis pelos sintomas e pela severidade das infecções causadas por *S. aureus* e, estudos recentes também têm mostrado que algumas cepas de CoNS também possuem genes de virulência como enterotoxinas e toxinas pirogênicas (CUNHA *et al.*, 2007).

Em PNH doentes, estafilococos já foram isolados em órgãos como coração, pulmão e fígado, cavidade nasal, abscessos, fluído ascítico, secreções oculares, fístulas e feridas. A transmissão da bactéria se dá por aerossóis e o óbito pode

ocorrer devido à ocorrência de pneumonia ou septicemia (KINDLOVITS & KINDLOVITS, 2009).

Em calitriquídeos, Kindlovits & Kindlovits (2009) citam ainda à contaminação por estafilococos através da ingestão de carne de cavalo crua, ocasionando febre, diarreia, edema mandibular e distensão abdominal. Em vida livre, foi encontrado um relato do isolamento de *S. aureus* a partir de hemocultura de um sagui (*C. jacchus*) que foi encontrado morto (COUTINHO *et al.*, 2007).

Nagel *et al.* (2013) relataram o óbito de um gorila (*Gorilla gorilla gorilla*) mantido no Centro de Primatologia do Centro Internacional de Pesquisas Médicas de Franceville, Gabão, devido à septicemia ocasionada por um clone de *S. aureus* relacionado a humanos. O clone ST72-t148 foi isolado em amostras de lesão de pele, coração e pulmão. *S. aureus* foi isolado em amostra de fluido cerebrospinal de um macaco de cheiro (*S. sciureus*) que apresentou meningoencefalite no exame *post mortem*. Lesões cardíacas e renais também foram encontradas e, segundo os autores, as mesmas foram secundárias à bacteremia (GARCIA *et al.*, 2009).

Em um estudo retrospectivo realizado por Kumar *et al.* (2012), foi verificado que a infecção por *S. aureus* estava entre as principais causas de aerossaculite espontânea em babuínos e chimpanzés mantidos em um centro de pesquisas americano. *S. aureus* estava entre os agentes etiológicos de pneumonias, artrites, miocardites, meningoencefalites, meningites, septicemias e abscessos em babuínos mantidos em cativeiro (DICK *et al.*, 2014). A infecção por *S. aureus* ocasionou estomatite necrótica aguda em um exemplar de *M. mulatta* recém-adquirido por um centro de pesquisas sul-coreano. O animal apresentou lesão ulcerativa profunda na mucosa labial durante o período de quarentena (LEE *et al.*, 2011).

Staphylococcus não-*aureus* causou dermatite generalizada, descamação da pele e eritema ocular em um macaco rhesus que foi exposto à radiação gama durante um experimento. Para os autores, o animal era portador assintomático da bactéria, porém uma imunossupressão secundária à exposição à radiação propiciou o desenvolvimento do microrganismo e o aparecimento dos sinais clínicos (KOLAPPASWAMY *et al.*, 2008).

Por outro lado, espécies de estafilococos também são relatadas em PNH selvagens e cativos sem a presença de sinais clínicos de doença. *S. aureus* e *S. epidermidis* foram encontrados na cavidade oral de *Saguinus oedipus* saudáveis mantidos em cativeiro (BROWN *et al.*, 1973). Aspis *et al.* (2003) também

encontraram *Staphylococcus* spp e *S. aureus* na cavidade oral de macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em um zoológico brasileiro. Igualmente, Mugisha *et al.* (2014) isolaram *S. aureus* em amostras da região nasofaringeana de chimpanzés mantidos em um santuário africano. Villers *et al.* (2008) relatam a ocorrência de estafilococos coagulase negativos em amostras de fezes de lêmures selvagens.

Lilenbaum *et al.* (2006) encontraram diferentes espécies de estafilococos na vagina de exemplares de micos-leões (*Leontopithecus* spp.) saudáveis mantidas em cativeiro. *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. arlettae*, *S. intermedius* e *S. simulans* foram as espécies relatadas. Da Silva *et al.* (2013) também encontraram espécies de estafilococos colonizando as mucosas vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) mantidos em cativeiro. As espécies mais frequentes em ambos os sexos foram *S. lentus*, *S. intermedius*, *S. urealyticus*, *S. arlettae*, *S. equorum* e *S. warneri*.

Schaumburg *et al.* (2013) realizaram um estudo para verificar a colonização por *S. aureus* em diferentes sítios anatômicos de lêmures e chimpanzés saudáveis de vida livre e de cativeiro e concluíram que a orofaringe e a vagina eram os locais mais colonizados por essa bactéria nessas espécies.

Em um estudo realizado com 731 macacos rhesus (*M. mulatta*) foi verificado que 39% dos animais tinham a cavidade nasal colonizada por vários clones de *S. aureus* molecularmente diferentes dos clones encontrados em humanos. Os autores concluíram que esses primatas são hospedeiros naturais de diferentes linhagens de *S. aureus* e representam um bom modelo experimental para pesquisas relacionadas aos mecanismos de colonização nasal e de infecção por esse microrganismo (VAN DEN BERG *et al.*, 2011).

Por outro lado, várias pesquisas realizadas nos últimos anos comprovam que a transmissão de estafilococos, em particular, o *S. aureus*, pode ser bidirecional entre humanos e PNH (SCHAUMBURG *et al.*, 2012, 2012a; NAGEL *et al.*, 2013).

Schaumburg *et al.* (2012a) encontraram uma alta prevalência de clones de *S. aureus* com sequence typing (ST) conhecidamente relacionado a humanos (ST15, ST80 e ST101) em chimpanzés mantidos em santuários em Zambia e Uganda. O contato intenso dos funcionários dos santuários com os animais foi apontado como a provável forma de transmissão da bactéria para os animais.

Análises moleculares realizadas com isolados de *S. aureus* obtidos de diferentes espécies de PNH africanos de vida livre revelaram a presença de dois

grupos distintos de isolados, sendo um grupo formado por clones de *S. aureus* com ST relacionado a humanos e outro grupo formado por clones com ST novos e não relacionados aos clones classicamente encontrados no homem. Ainda segundo os autores, a presença de clones de *S. aureus* adaptados a humanos em PNH, indicaria uma transmissão dessa bactéria de humanos para PNH, contudo mais estudos seriam necessários para elucidar a ocorrência de transmissibilidade inter e intraespécies na região alvo do estudo (SCHAUMBURG *et al.*, 2012).

Por fim, uma nova espécie de estafilococos coagulase negativo, o *Staphylococcus simiae*, foi identificada em 2005 em amostra de suabe retal e de fezes de micos de cheiro (*S. sciureus*) saudáveis e com diarreia, mantidos no Olomouc Zoo, República Tcheca. A presença por *S. aureus*, *S. cohnii* e *S. haemolyticus* também foi relatada nesses animais (PANTŮČEK *et al.*, 2005).

Embora classificada como espécie coagulase negativa, estudos moleculares revelaram que o *S. simiae* é muito próximo filogeneticamente do *S. aureus* e pertence ao grupo desta espécie. Os resultados de análises genômicas realizadas sugerem que *S. simiae* e *S. aureus* possuem um ancestral comum e que os diferentes mecanismos genéticos de patogenicidade encontrados nos demais membros desse grupo surgiram nas linhagens adaptadas a humanos (SUZUKI *et al.*, 2012).

2.2 RESISTÊNCIAS A ANTIMICROBIANOS EM ESTAFILOCOCOS DE PNH

O tratamento com antimicrobianos e a contaminação com linhagens resistentes associadas a humanos são citados como as principais causas da ocorrência de estafilococos resistentes a antibióticos em PNH em cativeiro (SCHAUMBURG *et al.*, 2012, Da SILVA *et al.*, 2013).

Da Silva *et al.* (2013) relatam uma alta resistência a penicilina, oxacilina, ácido fusídico e clindamicina em estafilococos isolados da mucosa vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) cativos. Em contraste, 100% de sensibilidade à gentamicina, ciprofloxacina e norfloxacina foi observada. Segundo os autores, o uso constante de antibióticos nesses animais pode ter ocasionado as resistências.

Lilenbaum *et al.* (2006) relatam elevados níveis de resistência a penicilina, tetraciclina, rifampicina, ampicilina, estreptomicina e sulfametoxazol/trimetoprim em

diferentes espécies de estafilococos isoladas da mucosa vaginal de espécies de *Leontopithecus* mantidas em cativeiro. A alta frequência de resistência observada neste trabalho surpreendeu os autores, pois os animais estudados não tinham histórico de exposição prévia a antibióticos.

Significativas taxas de resistência a antimicrobianos também foram observadas em *S. aureus* e não-*aureus* obtidos da cavidade oral de macacos-prego cativos que não receberam tratamento prévio com antimicrobianos. Amoxicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e clindamicina foram os antibióticos que apresentaram menor capacidade de inibição (ASPIS *et al.*, 2003).

Em PNH do velho mundo, Schaumburg *et al.* (2012) descrevem uma baixa ocorrência de resistência nos isolados de *S. aureus* obtidos de PNH africanos de vida livre. Apenas 2,9% dos isolados foram resistentes à penicilina e todos foram sensíveis a meticilina, a vancomicina e a outras classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e lincosâmidas. Por outro lado, alta ocorrência de resistência a antimicrobianos é relatada em diferentes clones de *S. aureus* isolados de chimpanzés mantidos em santuários na África. Resistência à penicilina, tetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol/trimetoprim e clindamicina foi encontrada (SCHAUMBURG *et al.*, 2012a).

Nagel *et al.* (2013) relatam resistência a penicilina e a ampicilina em uma cepa de *S. aureus* que causou septicemia de gorila mantido em um centro de pesquisas médicas africano que veio a óbito. Resistência à penicilina também foi encontrada em *S. aureus* isolados de lêmures e chimpanzés selvagens e mantidos em cativeiro, sendo que a frequência de isolados resistentes foi maior nos animais cativos, que também apresentaram resistência a tetraciclina, eritromicina, clindamicina e cotrimoxazol (SCHAUMBURG *et al.*, 2013).

Multirresistência a beta-lactâmicos, incluindo a meticilina, quinolonas, sulfonamida e lincosamina, foi verificada em um isolado de *Staphylococcus* não-*aureus* obtido a partir de lesão de pele de um exemplar de *M. mulatta* que apresentou um quadro de dermatite generalizada após a exposição à radiação gama durante um experimento (KOLAPPASWAMY *et al.*, 2008).

Em um exemplar de macaco rhesus, MRSA foi isolado em uma lesão profunda na mucosa oral. O isolado também apresentou resistência a norfloxacina, penicilina, tetraciclina, levofloxacina e ciprofloxacina (LEE *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

Esta investigação tem como principais objetivos:

- Determinar a distribuição de espécies e tipos clonais de estafilococos em mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) e híbridos de saguis (*Callithrix* spp.) introduzidos na região de ocorrência natural do mico-leão-dourado;
- Avaliar o padrão de resistência fenotípica a antimicrobianos dos estafilococos presentes na microbiota gastrintestinal de híbridos de saguis e mico-leão dourado em vida livre;
- Verificar a ocorrência de estafilococos portadores de genes de resistência e de virulência na espécie invasora e na espécie nativa;
- Determinar a existência de disseminação cruzada de estirpes de estafilococos entre a espécie invasora e nativa.

4. JUSTIFICATIVAS

- Estudos recentes demonstram que PNH em vida livre podem ser colonizados por estafilococos que carregam fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos;
- É conhecido que PNH do velho mundo cativos e selvagens podem albergar clones de *S. aureus* relacionados a humanos, contudo estudos sobre as características filogenéticas dos estafilococos isolados de PNH neotropicais são praticamente inexistentes;
- Uma avaliação sobre o background genético e a existência de uma provável disseminação cruzada de estirpes bacterianas entre a espécie exótica (*Callithrix* spp.) e a espécie nativa (*L. rosalia*) nunca foi realizada na região alvo deste estudo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS

Os suabes foram pré-enriquecidos em 2,0 mL de caldo BHI (HiMedia, Índia) com 7,5% de NaCl e incubados em aerobiose a 37°C por 24h. Após centrifugação (13.000 rpm por 5 min), o pellet foi cultivado em meio ágar manitol salgado (HiMedia, Índia) em aerobiose a 37°C por 24-48h. Para observação do padrão de hemólise 3 a 4 colônias foram selecionadas e recultivadas em ágar sangue base (HiMedia, Índia) com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado em aerobiose a 37°C por 24h. O gênero bacteriano foi determinado com base na morfologia da colônia, coloração de Gram, teste da catalase e teste da oxidase.

A identificação presuntiva das espécies de estafilococos foi feita através da realização de provas bioquímicas previamente descritas (QUINN *et al.*, 1994) onde foram avaliadas as seguintes características: fermentação de carboidratos (manitol, maltose e ribose) e produção de urease, acetoina, Dnase e coagulase.

A utilização do manitol foi evidenciada pela coloração amarelada do meio ágar manitol salgado após o período de incubação supracitado. A fermentação da maltose e da ribose foi verificada através da inoculação de uma pequena porção da cultura bacteriana em caldo base (HiMedia, Índia) com 0,5% do açúcar correspondente. A positividade do teste foi evidenciada pela mudança da cor do meio roxo para amarelo após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 48h.

A produção de acetoina foi avaliada na prova de Voges-Proskauer (VP). Uma amostra da colônia foi inoculada em 2,0 mL de caldo BHI (HiMedia, Índia). Após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 48h foi adicionado 4 gotas de hidróxido de potássio 40% e 1,0 mL de α -naftol 5%. A presença de um halo vermelho na superfície indica positividade. A produção da enzima urease foi verificada através da inoculação de uma porção da colônia em caldo ureia (INLAB, Brasil). A degradação da ureia a amônia foi verificada a partir da mudança de cor do meio para rosa, após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 48h.

Para verificar a produção da coagulase, uma pequena quantidade da cultura bacteriana foi inoculada em 200 μ L de plasma de coelho (Difco, EUA). A leitura do

teste foi realizada após 4, 8 e 24h de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. A presença da enzima Dnase foi verificada através da semeadura em meio ágar Dnase (Himedia, Índia). Após a incubação em estufa bacteriológica a 37°C, por 24h foi verificada a presença de um halo transparente ao redor da colônia após a adição de solução de HCL 3N. Nas colônias previamente identificadas como *S. aureus* foi feita a confirmação da espécie utilizando o Staphaurex Plus Kit (Remel, UK).

5.2 TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade a 13 antimicrobianos foi avaliada pela técnica de Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) de difusão de disco em ágar Muller Hinton, de acordo com as instruções do CLSI (2011): penicilina G (PEN, 10 UI), oxacilina (OXA, 1µg), vancomicina (VAN, 30 µg) linezolid (LNZ, 30 µg) gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), eritromicina (ERY, 15µg), clindamicina (CLI, 2 µg), quinupristina/dalfopristina (QDA, 15µg) tetraciclina (TET, 30µg), rifampicina (RIF, 5µg), ácido fusídico (FD, 10µg) e sulfametaxazol/ trimetoprim (SXT, 25µg).

Os isolados foram classificados em sensíveis, intermediários ou resistentes de acordo com a zona de inibição formada em torno dos discos dos antibióticos (Oxoid, UK). Foi utilizada a estirpe *S. aureus* ATCC 25923 como controle positivo. Para os isolados que apresentaram perfil resistente ou intermediário para oxacilina e/ou vancomicina a concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada por Etest (bioMérieux, França).

Para a realização do Etest, os isolados foram crescidos em ágar TSA (Merck, USA) a 37°C/12h. Uma alíquota foi diluída em solução salina estéril na leitura 0,5 da escala de McFarland, como previamente descrito. A solução bacteriana foi semeada em ágar Muller Hinton com suabe estéril por induto contínuo. Uma fita de Etest de cada antibiótico testado foi colocada assepticamente no centro da placa. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Foram utilizadas as estirpes ATCC 29213 como controle positivo.

Foram considerados resistentes a oxacilina os isolados de *S. aureus* que apresentaram MIC \geq 4,0 µg/mL a oxacilina e os isolados de CoNS que apresentaram MIC \geq 0,5 µg/mL. Para vancomicina o ponto de corte de resistência para *S. aureus* e CoNS foi MIC \geq 16 µg/mL e \geq 32 µg/mL, respectivamente (CLSI, 2011). Adicionalmente, também foi realizado Etest para os isolados que apresentaram

resistência ao ácido fusídico. Foram considerados resistentes, os isolados que apresentaram MIC \geq 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (EUCAST, 2014).

5.3 ENSAIOS MOLECULARES

5.3.1 Extração do DNA cromossomal

O DNA cromossomal dos isolados de *S. aureus* foi extraído utilizando o método descrito por Aires-de-Souza *et al.* (2007). Em um tubo tipo eppendorf uma alçada da cultura crescida em meio ágar TSA (Merck, Alemanha), a 37°C/12h foi incubada com 20 μL de TE 1x (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) e 1 μL de lisostafina 10 mg/ml (Sigma, EUA) a 37°C por 2h. Em seguida, a solução foi incubada a 95°C por 15 min. 180 μL de água milliQ estéril foi adicionada à solução que foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 5 min. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A concentração do produto foi determinada no NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA). O DNA extraído foi armazenado a - 20°C.

O DNA cromossomal dos isolados de CoNS foi extraído usando o método do Isotiocianato (ROLO *et al.*, 2014). Em um tubo tipo eppendorf, uma alçada da cultura crescida em meio ágar TSA, a 37°C/12h foi homogeneizada com 150 μL de tampão TEG (50 mM glucose, 25 mM Tris, 10mM EDTA pH 8). A solução foi incubada a 37°C por 3h com 110 μL de mix de lise [75 μL de lisostafina (0,1 mg/mL), 10 μL lisozima (125 mg/mL), 12.5 μL de proteinase K (125 mg/mL) e 12.5 μL de SDS 10%]. Após esse período, cerca de 50 μL de sobrenadante foi adicionado a um novo tubo e 50 μL de solução de celite e 600 μL de tampão de lise I (guanidina-isotiocianato 4M, 0,1M Tris-HCl pH 6,4, 0,3M EDTA pH 8,0, TritonX-100) foram adicionados. A solução foi homogeneizada por 10 min. e, em seguida, centrifugada a 13.000 rpm por 1 min e o sobrenadante foi descartado.

Ao pellet, foi adicionado 500 μL de tampão de lise II (guanidina-isotiocianato 4M e 0,1M Tris-HCl pH 6,4). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e no pellet foi realizado novamente o procedimento descrito anteriormente. Após as duas séries de lavagem do pellet com o tampão de lise II foram realizadas duas etapas de lavagens com 500 μL de etanol 70% e mais duas etapas de lavagens com igual volume de acetona.

Em seguida, o tubo com pellet foi levado com a tampa aberta a estufa a 50°C por 10 min. Após esse período, 100 µL de tris HCl 10 mM pH8 foram adicionados ao tubo. A solução foi homogeneizada e incubada a 56°C por 10 min. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o mesmo foi armazenado a - 20°C até a realização dos ensaios de PCR.

5.3.2 Identificação molecular das espécies de estafilococos

A confirmação molecular da espécie dos isolados de *S. aureus* foi feita através da amplificação por uniplex PCR do gene *nuc* como previamente descrito (POULSEN *et al.*, 2003). Cada reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de tampão PCR 5X (Promega, EUA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, EUA), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen, UK) (apêndice B), 25,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra (Alemanha) nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 10 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 53°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A reação foi terminada com um ciclo de 72°C por 10 min. Para confirmar a amplificação e determinar o tamanho do produto, 5 µL do marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) e igual volume do produto da PCR foram corridos em eletroforese em gel de agarose 1% (Lonza, UK) com brometo de etídeo (BioRad, EUA) em tampão TAE1x (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0,001M). A corrida foi avaliada no transluminador (BioRad, EUA) com luz UV.

A confirmação molecular da espécie dos isolados de CoNS foi feita através da amplificação por uniplex PCR e sequenciamento de uma região interna do gene *tuf* (elongation factor Tu) (MARTINEAU *et al.*, 2001). A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 5 µL de PCR buffer 10X (Applied Biosystems, EUA), 4 µL de dNTPs 2mM (BIORON, Alemanha), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen,UK) (apêndice B), 33,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima AmpliTaq 5U/µL (Applied Biosystems,USA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 96°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 1 min. e 72°C por 30 seg. A

reação foi terminada com um ciclo de 72°C por 3 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente.

O produto amplificado foi purificado utilizando uma mistura de Exonuclease-EXO (Biolabs, UK) e Shrimp Alkaline Phosphatase-SAP (USB, Amersham, EUA). 30 µL de produto foram adicionados a um novo tubo para PCR e homogeneizados com 6 µL da enzima EXO a 1U/ µL e igual volume da enzima SAP a 1U/ µL. A reação foi conduzida no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo a 37°C por 30 min. e um ciclo a 80°C por 20 min. A confirmação da pureza dos produtos foi feita no NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). 5 µL de produto purificado e 5 µL dos primers a 5 pmol/ µL foram enviados a GATC Biotech AG (<http://www.gatc-biotech.com>) para a realização do sequenciamento.

As sequências obtidas foram analisadas usando o software SeqManII (DNASTAR) e comparadas com sequências do gene *tuf* com tamanhos que variaram de 345 a 348 pb, depositadas na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.3.3 Tipagem do gene de Proteína A de *S. aureus* (*spa*)

O *spa* type foi determinado através da amplificação por uniplex PCR e sequenciamento (SHOPSIN *et al.*, 1999). A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de PCR buffer 5X (Promega, USA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, EUA), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen, UK) (apêndice B), 25,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 10 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 58°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg. A reação foi terminada com um ciclo de 72°C por 10 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente.

O produto amplificado foi purificado utilizando o método da EXOSAP conforme descrito anteriormente. Os produtos purificados foram enviados a MacroGen para sequenciamento (<http://www.macrogen.com>). As sequências obtidas foram analisadas usando o Ridom-Staph software e a base de dados RIDOM (<http://spaserver.ridom.de>).

5.3.4 Detecção dos genes *mecA* e *mecC*

Em todos os isolados de *S. aureus* e CoNS foi verificada a presença dos genes *mecA* e *mecC* por uniplex PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2012). Na pesquisa do gene *mecA*, a reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de tampão de PCR 5X (Promega, EUA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, EUA), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen,UK) (apêndice B), 25,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 4 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min., 58°C por 1 min. e 72°C por 2 min. A reação foi finalizada com um ciclo de 72°C por 10 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente. Na pesquisa do gene *mecC* foram utilizadas as seguintes condições: um ciclo de 94°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada com um ciclo de 72°C por 7 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente.

5.3.5 Amplificação e sequenciamento da região do promotor do gene *mecA-1*

Em todos os isolados de *S. sciuri* foi feito a amplificação e o sequenciamento da região do promotor do gene *mecA-1* por uniplex PCR (FREY *et al.*, 2013). A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de PCR buffer 5X (Promega, EUA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, EUA), 2 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen,UK) (apêndice B), 23,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 10 min., seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 40°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada com um ciclo de 72 °C por 10 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente.

O produto amplificado foi purificado utilizando o método da EXOSAP conforme descrito anteriormente. Os produtos purificados foram enviados a GATC Biotech AG (<http://www.gatc-biotech.com>) para a realização do sequenciamento. As sequências

obtidas foram analisadas usando o software SeqManII (DNASTAR) e comparadas com a sequência do promotor do gene *mecA1* da estirpe de *S. sciuri* K11, que encontra-se na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.3.6 Detecção do gene *blaZ*

Nos isolados resistentes à penicilina foi verificada a presença do gene *blaZ* como previamente descrito por Milheiriço *et al.* (2011). A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de PCR buffer 5X (Promega, USA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, USA), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen, UK) (apêndice B), 25,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, USA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 4 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada com um ciclo de 72 °C por 10 min. O tamanho do produto foi determinado como descrito anteriormente.

5.3.7 Detecção dos genes *fusB* e *fusC*

Nos isolados que apresentaram resistência ao ácido fusídico foi verificada a presença dos genes *fusB* e *fusC* por multiplex PCR (MCLAWS *et al.*, 2008). A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 5 µL de PCR buffer 10X (Applied Biosystems, EUA), 3,125 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 2 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen, UK) (apêndice B), 28,475 µL de água milliQ estéril, 0,4 µL de enzima AmpliTaq 5U/µL (Applied Biosystems, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 3 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 47°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A reação foi finalizada com um ciclo de 72 °C por 10 min. O tamanho dos produtos foi determinado em eletroforese com gel de agarose em 2%.

5.3.8 Detecção de genes de fatores de virulência

Sequências específicas de fatores de virulência foram pesquisadas através da realização de multiplex PCR: leucocidinas Pantón-Valentine (PVL), LukE-D (*lukED*) e

classe F (*lukM*), enterotoxinas *sea-e*, *seg-j*, *sep* e *sel*, toxina da síndrome do choque tóxico TSST-1 (*tst*), exfolitinas *eta*, *etb* e *etd* e hemolisinas gamma (*hlg*), gamma variante (*hlgv*) e beta (*hlb*) (apêndice B). As condições das reações encontram-se nas tabelas 6 a 10. O tamanho dos produtos foi determinado em eletroforese com gel de agarose 2% (MONDAY *et al.*, 1999, JARRAUD *et al.*, 2002).

Tabela 6: Multiplex PCR para detecção de toxinas de estafilococos. (Modificado de Monday *et al.*, 1999).

Reagente	Volume (µl)
PCR buffer 10X	2
dNTPs (2mM)	0,8
Primer Sea F e R (15pmol)	0,2 (cada)
Primer Seb F (15pmol)	0,4
Primer Sec F e R (15pmol)	0,4/0,6
Primer Seh F e R (15pmol)	0,4 (cada)
Primer Sej F e R (15pmol)	0,2 (cada)
Primer 16S F e R (15pmol)	0,2 (cada)
H2O MilliQ	8,45
Enzima AmpliTaq (5 U/ul)	0,35
DNA	5
Volume total da reação	20

Reação: um ciclo de 94°C/10min., 30 ciclos de 95°C/1min., 58°C/45seg., 72°C/1 min., um ciclo de 72°C/10min.

Tabela 7: Multiplex PCR para detecção de toxinas de estafilococos. (Modificado de Jarraud *et al.*, 2002).

Reagente	Volume (µl)
PCR Buffer 0X	2
dNTPs (2mM)	0,8
Primer Sed F e R (15pmol)	0,2 (cada)
Primer Seg F e R (15pmol)	0,2 (cada)
Primer See F e R (15pmol)	0,4 (cada)
Primer Sei F e R (15pmol)	0,2 (cada)
Primer Tst F e R (30pmol)	0,8 (cada)
Primer 16S F e R (15pmol)	0,2 (cada)

H2O MilliQ	7,85
Enzima AmpliTaq (5 U/ul)	0,35
DNA	5
Volume total da reação	20

Reação: um ciclo de 94°C/10min., 30 ciclos de 95°C/1min., 58°C /45seg.,72°C/1 min., um ciclo de 72°C/10min.

Tabela 8: Multiplex PCR para detecção de toxinas de estafilococos.(Modificado de Jarraud *et al.*, 2002).

Reagente	Volume (µl)
PCR Buffer 10X	5
dNTPs (2mM)	3,125
Primer Nsep-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer Nhlgv-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer Nhlb-1 e 2 (5pmol)	2 (cada)
Primer Nsel (bov)-1 e 2 (5pmol)	2 (cada)
H2O MilliQ	22,475
Enzima AmpliTaq (5 U/ul)	0,4
DNA	5
Total volume PCR reaction	50

Reação: um ciclo de 94°C/5min., 25 ciclos de 94°C /30seg., 55°C /30seg.,72°C /1min., um ciclo de 72°C /7min.

Tabela 9: Multiplex PCR para detecção de toxinas de estafilococos.(Modificado de Jarraud *et al.*, 2002).

Reagente	Volume (µl)
PCR Buffer 10X	5
dNTPs (2mM)	3,125
Primer Neta-1 e 2 (5pmol)	2 (cada)
Primer Netb-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer Nhlg-1 e 2 (5pmol)	1,5
H2O MilliQ	26,475
Enzima AmpliTaq (5 U/ul)	0,4
DNA	5
Total volume PCR reaction	50

Reação: um ciclo de 94°C/5min., 25 ciclos de 94°C /30seg., 58°C/30seg.,72°C/1min., um ciclo de 72°C/7min.

Tabela 10: Multiplex PCR para detecção de toxinas de estafilococos. (Modificado de Jarraud *et al.*, 2002).

Reagente	Volume (µl)
PCR Buffer 10X	5
dNTPs (2mM)	3,125
Primer LukM-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer pvl-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer Netd-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
Primer Nlukde-1 e 2 (5pmol)	1,5 (cada)
H2O MilliQ	24,475
Enzima AmpliTaq (5 U/ul)	0,4
DNA	5
Total volume PCR reaction	50

Reação: um ciclo de 94°C/5min., 25 ciclos de 94°C /30seg., 55°C /30seg., 72°C /1min., um ciclo de 72°C /7min.

5.6.9 Gel de Eletroforese em Campo Pulsável (PFGE)

O PFGE foi realizado com todos os isolados de estafilococos de acordo com Chung *et al.* (2000). Previamente, foram confeccionados discos de agarose com DNA para cada isolado da seguinte forma: As bactérias foram cultivadas em 4,0 mL de caldo TSB (Merck, EUA) a 37°C overnight. 500 µL da suspensão bacteriana foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 500 µL de PIV (0,01 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M NaCl). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 2 min. O pellet foi resuspendido em 200 µL de PIV. 5 µL dessa suspensão foram adicionados a cubeta contendo 1 mL de PIV para a padronização da concentração celular, mensurando a densidade ótica a 620nm em espectrofotômetro. A concentração foi ajustada a OD=5 utilizando a seguinte fórmula: $V_{add} (\mu L) = (OD \times 40 \times 210) - 210$.

Posteriormente, 0,15 g de low melting temperature agarose (FMC bioproducts, EUA) foi dissolvida em 10 mL de PIV e mantida a 42°C durante o uso. Em uma placa de vidro (20x20cm) foram dispostas lâminas de vidro (20x20cm) nas extremidades horizontalmente. Em seguida, lâminas de vidro foram colocadas paralelamente. 100 µL de suspensão bacteriana com OD=5 foram homogeneizadas com 100 µL de low melting agarose. 20 µL da mistura foram distribuídos nas lâminas

dispostas em paralelo mantendo uma distância de cerca de um cm entre as alíquotas (figura 10). Sobre cada lâmina com as alíquotas foi depositado outra lâmina exercendo uma leve pressão. A placa foi incubada no congelador por 5 minutos seguidos de 10 minutos na temperatura ambiente.

Os discos de agarose solidificados foram cuidadosamente transferidos para um tubo falcon de 15 mL com auxílio de alça bacteriológica de plástico. O tubo com os discos foi incubado a 37°C por 3-5 horas com 500 µL de solução de lise (6mM Tris pH 8,0, 1M NaCl, 100mM EDTA pH 8,0, 0,2% Na deoxicolato, 0,5% Na laurilsarcosina) contendo 2,5 µL de Rnase (Sigma, EUA) a 10mg/mL e igual volume de lisozima (Sigma, EUA) a 20 mg/mL e lisoestafina (Sigma, EUA) a 10mg/mL. Após esse período, a solução de lise foi completamente descartada e foram adicionados 500 µL de solução ESP [0,5M EDTA pH 9,0, 1% sarcosyl, 0,5 mg proteinase K (Sigma, EUA)] ao tubo que foi incubado em estufa a 50°C/12h. Por fim, os discos de agarose com DNA foram lavados com 13 mL de solução TE (10 mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0) em leve agitação por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido 6 vezes. Os discos foram armazenados em solução TE a 4°C até a realização do PFGE.

No dia anterior à realização do PFGE um disco de cada isolado foi incubado overnight a 37°C com 40 µL de solução de restrição (5 µL Buffer Tango 10X (Fermentas, EUA), 34,8 µL de água milliQ estéril, 0,2 µL endonuclease SmaI (Fermentas) a 50U/µL). No dia da corrida, foi preparado 200 mL de PFGE agarose (BioRad, EUA) em 1% com tampão TBE 0,5% (BioRad, EUA). Após a solidificação do gel, os discos foram cuidadosamente inseridos nos poços do gel que foram selados com PFGE agarose. 2 litros de tampão TBE 0,5% foram adicionados à câmara de PFGE (BioRad, EUA). As condições da corrida foram: temperatura de 11,3°C, 6V/cm, pulso inicial de 5 seg, pulso final de 35 seg. e tempo total de corrida de 23h. Após o término da corrida, o gel foi imerso em 500 mL de solução de brometo de etídeo a 0,375mg/L por 20 min. Em seguida, o gel foi lavado com 500 mL de água destilada por 30-60 min. A leitura do gel foi feita em transluminador sob luz UV.

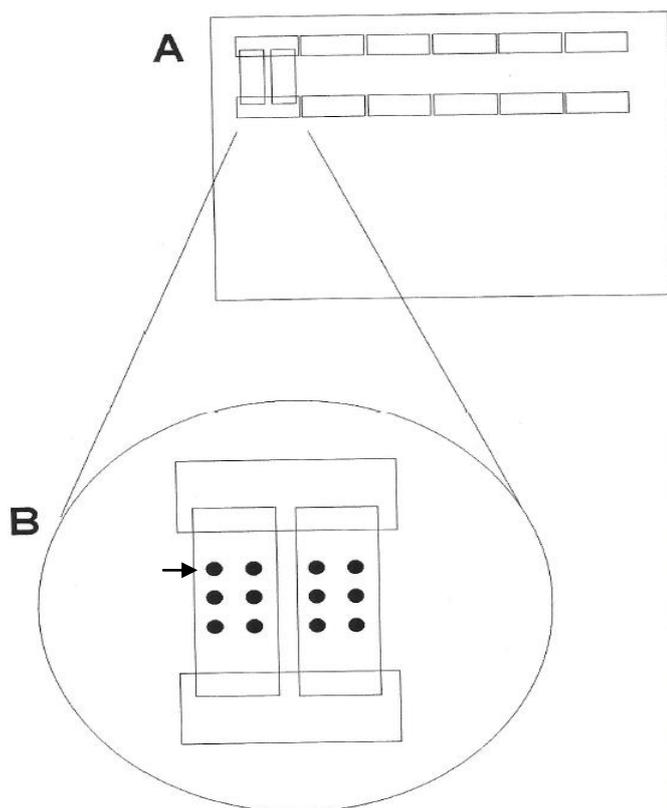


Figura 11: Esquema ilustrativo para a confecção dos discos de agarose com DNA para a realização de PFGE. A: colocação das lâminas na placa de vidro; B: alíquotas de low melting agarose com suspensão celular sobre as lâminas para a formação dos discos de agarose com DNA (seta).

O padrão de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. aureus* foi comparado com o padrão de restrição de clones representativos dos STs determinados através do MLST usando o software BioNumerics versão 4.61 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgica), com perfil de análise previamente estabelecido (otimização: 0.5%, tolerância: 1.3%, cut-off: 80%) (FARIA *et al.*, 2008). Os isolados de CoNS foram agrupados de acordo com a espécie e a análise do padrão de restrição foi intraespécie. Os padrões de análise foram: otimização: 0.5%, tolerância: 1.3% e cut-off: 100%.

Para a padronização das bandas e controle da enzima de restrição foi utilizado a cepa NCTC 8325. O tamanho das bandas foi estipulado utilizando o marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs inc., EUA). Foram utilizados como controles positivos para os genes *mecA* as estirpes *S. aureus* COL e *S. sciuri* K3 e para o gene *blaZ* *S. aureus* HSA74. Como controle negativo para o *mecA* foi utilizada a estirpe *S. sciuri* K1 (ROLO *et al.*, 2014).

5.3.10 Multilocus Sequence Typing (MLST) dos isolados de *S. aureus*

O MLST foi realizado como previamente descrito (ENRIGHT *et al.*, 2000) para 10 isolados de *S. aureus* que foram selecionados de acordo com o spa type e com o padrão de subtipagem do PFGE. A reação foi realizada com volume final de 50 µL contendo 10 µL de PCR buffer 5X (Promega, USA), 4 µL de dNTPs a 2mM cada (BIORON, Alemanha), 3 µL de MgCl₂ 2.5mM (Promega, USA), 1 µL de cada primer a 20 pmol/µL (Invitrogen, UK) (apêndice B), 25,75 µL de água milliQ estéril, 0,25 µL de enzima GoTaq 5U/µL (Promega, EUA) e 5 µL de DNA. O DNA foi amplificado no termociclador Biometra nas seguintes condições: um ciclo de 94°C por 4 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg. A reação foi terminada com um ciclo de 72 °C por 10 min. O tamanho do produto foi determinado conforme descrito anteriormente.

O produto amplificado foi purificado utilizando o método da EXOSAP conforme descrito anteriormente. Os produtos purificados foram enviados a GATC Biotech AG (<http://www.gatc-biotech.com>) para a realização do sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas usando o software SeqManII (DNASTAR). Os alelos e o respectivo perfil alélico correspondente foram atribuídos usando a base de dados de MLST (<http://www.mlst.net/>). Para os demais 31 isolados de *S. aureus*, o ST foi inferido baseado na similaridade do padrão de PFGE.

5.5.11 Southern blotting para os genes *mecA* e *blaZ*

Para determinar a presença do gene *mecA* em todos os isolados e, do gene *blaZ* nos isolados que apresentaram resistência a penicilina, os fragmentos de DNA em gel de PFGE foram transferidos por vacuum blotting como previamente descrito (DE LENCASTRE *et al.*, 1994) para uma membrana de nylon (GE healthcare, UK) e hibridizados com sonda do *mecA* com 1039 bp e do *blaZ* com 533 bp usando o kit ECL Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, UK), seguindo as instruções do fabricante. A revelação foi feita em câmara escura através da exposição da membrana a folha de filme autorradiográfico (Kodak, EUA) por aproximadamente 12 horas.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS AMOSTRADOS

No total, foram coletados suabes da cavidade oral e retal de 151 micos-leões-dourados e 50 saguis. As características dos animais amostrados e as áreas de ocorrência dos mesmos estão descritas no item 6.1 do capítulo 1.

6.2. ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS ISOLADAS E OCORRÊNCIA

Foram obtidos 85 isolados de estafilococos sendo 33 *S. aureus* e 52 CoNS. Quatro espécies de CoNS foram identificadas através da amplificação e sequenciamento do gene *tuf*: *S. sciuri* (n=33), *S. simiae* (n=11), *S. xylosus* (n=6) e *S. saprophyticus* (n=2) sendo que o *S. simiae* foi encontrado apenas em micos-leões enquanto que as outras espécies de CoNS foram encontradas em ambas as espécies de PNH.

97% (32/33) dos isolados de *S. aureus* foram obtidos de micos-leões e 3% (1/33) foram obtidos de saguis. Do total de isolados de CoNS, 69,2% (36/52) foram obtidos de micos-leões e 30,8% (16/52) foram obtidos de saguis. Do total de isolados obtidos de micos-leões 53% (36/68) foram obtidos da cavidade oral e 47% (32/68) da cavidade anal. A mesma proporção foi encontrada nas cavidades oral e anal de saguis.

A ocorrência de estafilocos em micos-leões-dourados foi de 30,46% (46/151) e em saguis foi de 30% (15/50). Entre os micos-leões colonizados por estafilococos, 22 eram adultos, 17 eram jovens e 7 eram filhotes sendo que 55,3% eram machos e 44,7% eram fêmeas. Entre os saguis colonizados, 11 eram adultos e 4 eram jovens sendo que 53,3% eram fêmeas e 46,7% eram machos. A diversidade de espécies foi maior em micos-leões, já que dos 46 micos-leões colonizados por estafilococos, 10 apresentaram cocolonização por mais de uma espécie desse gênero. Na tabela 11 encontra-se a distribuição das espécies de estafilococos de acordo com a espécie de PNH, o sítio de coleta e o local de ocorrência dos animais.

Tabela 11: espécies de estafilococos encontradas nas regiões oral e anal de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) e híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) ocorridos em vida livre no Rio de Janeiro.

Bactéria	<i>L. rosalia</i> (Rebio) (n=51)			<i>L. rosalia</i> (RPPN) (n=50)			<i>Callithrix</i> spp. (n=50)		
	oral	anal	animais colonizados	oral	anal	animais colonizados	oral	anal	animais colonizados
<i>S. aureus</i>	13	13	37%	4	2	12%		1	2%
<i>S. sciuri</i>	2	2	8%	11	7	30%	7	4	18%
<i>S. xylosus</i>	1	1	4%				2	2	8%
<i>S. saprophyticus</i>				1		2%		1	2%
<i>S. simiae</i>	3	1	6%	1	6	14%			

RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; Rebio: Reserva biológica.

6.3 SUSCETIBILIDADES A ANTIMICROBIANOS

6.3.1 *S. aureus*

No teste de difusão em disco, 10 dos 13 antimicrobianos testados foram eficientes contra todos os isolados de *S. aureus* e 30,3% (10/33) dos isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Um isolado apresentou sensibilidade intermediária a eritromicina e 9 isolados a vancomicina. Um isolado foi resistente à vancomicina e 20 isolados apresentaram resistência ao ácido fusídico. Por outro lado, todos os isolados de *S. aureus* mostraram-se sensíveis à vancomicina e ao ácido fusídico no Etest.

6.3.2 CoNS

No teste de difusão em disco, 7 dos 13 antibióticos testados foram eficientes contra todos os isolados de CoNS: gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, quinupristina/dalfopristina, ciprofloxacina, rifampicina e linezolid. 21% (11/52) dos isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados. As taxas de sensibilidade intermediária foram 61,5% (32/52) para oxacilina e 15,4% (8/52) para clindamina e de resistência foram 2% para a oxacilina, 17,3% (9/52) para a penicilina, 57,7% (30/52) para a vancomicina, 5,7% (3/52) para a eritromicina e 78,8% (41/52) ao ácido fusídico. Multirresistência a penicilina,

oxacilina e ácido fusídico foi encontrada em 7 isolados de *S. sciuri* pertencentes a 4 saguis e 3 micos-leões que ocorrem em RPPNs.

No Etest, todos os CoNS que apresentaram resistência a vancomicina no método de difusão em disco foram sensíveis, por outro lado, todos os isolados que foram resistentes e que apresentaram sensibilidade intermediária a oxacilina no método de difusão em disco foram resistentes no Etest e 92,7% (38/41) dos CoNS resistentes ao ácido fusídico no método de difusão em disco mostraram-se resistentes no Etest (figura 12). Na figura 13 encontra-se ilustrado o perfil de resistência dos estafilococos aos antimicrobianos testados.

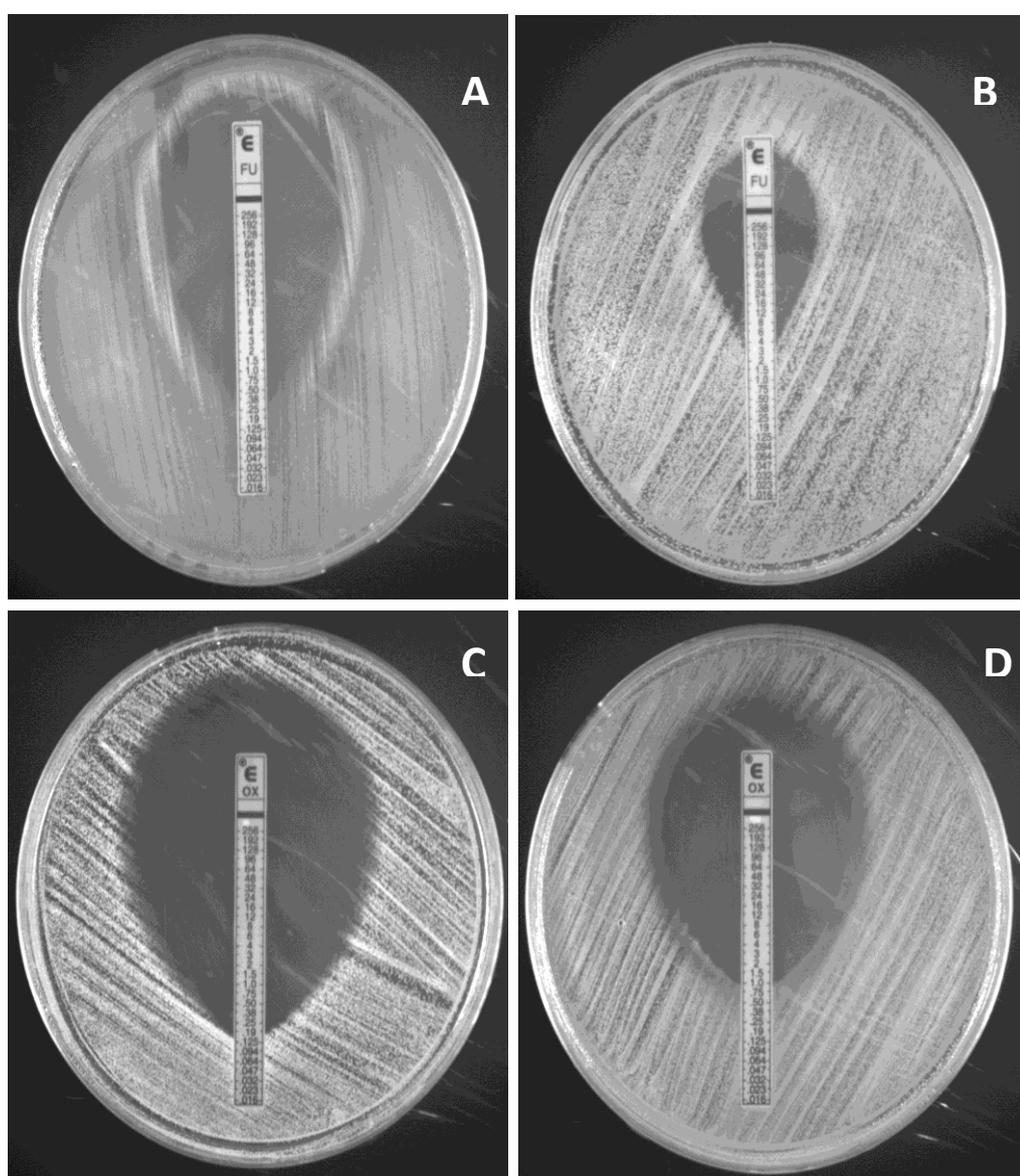


Figura 12: Resistências a antibióticos no Etest em estafilococos isolados de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) e híbridos de sangue (*Callithrix* spp.) de vida livre. A e C: cepa ATCC 29213 sensível ao ácido fusídico e a oxacilina respectivamente. B e D: CoNS resistente ao ácido fusídico e a oxacilina respectivamente.

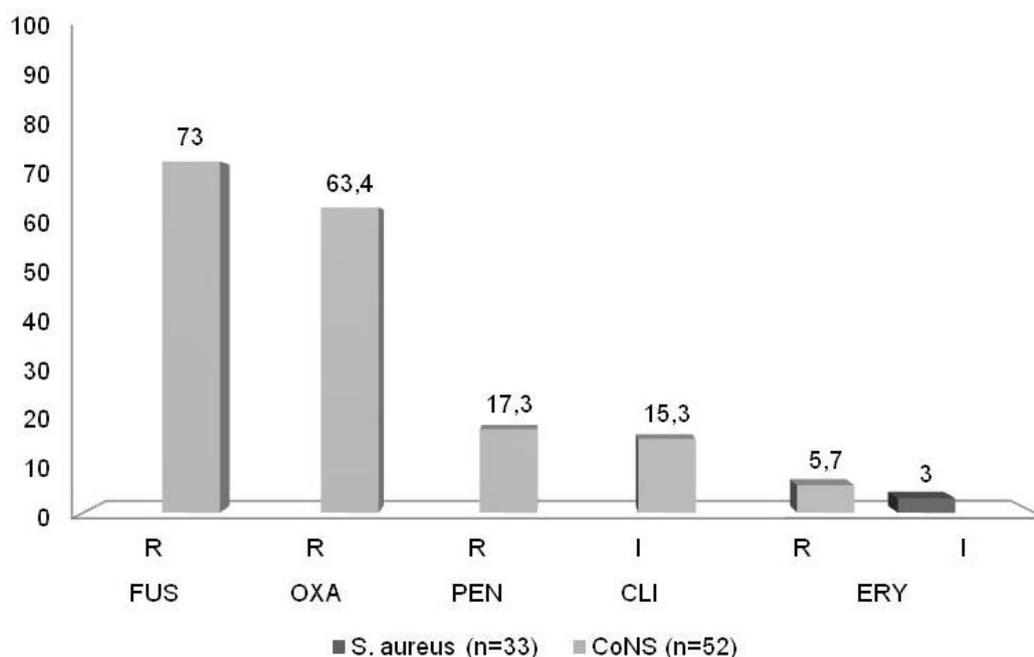


Figura 13: Resistências a antibióticos em estafilococos isolados das cavidades oral e anal de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) e híbridos de sanguis (*Callithrix* spp.) de vida livre. FUS: ácido fusídico; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; CLI: clindamicina; ERY: eritromicina; CoNS: estafilococos coagulase negativos.

6.4 ANÁLISES MOLECULARES

6.4.1 Tipagem de proteína A de *S. aureus* (*spa*) e Multilocus Sequence Typing (MLST)

Um total de 5 *spa* types e 5 STs foi identificado. ST6-t701, t5271, t7396, ST188-189, ST2985-189 e ST133 foram isolados apenas em micos-leões e o ST1-t13736 correspondeu ao único isolado de *S. aureus* obtido de sagui. O *spa* type predominante nos micos-leões foi o t701 (n=17) seguido do t189 (n=8), t5271 (n=5) e t7396 (n=1). Não foi possível determinar o *spa* type do ST133. O ST predominante nos micos-leões foi o ST6 (n=23) seguido do ST188 (n=6), ST133 (n=1) e ST2985 (n=2). Um total de 51,5% (n=17) dos isolados de *S. aureus* correspondia ao clone ST6-t701. Outros clones menos frequentes foram ST188-t189 (18.2%), ST6-t5271 (15%), ST6-t7396 (3%), ST2985-t189 (6%), e, ST1-t13736 e ST 133 com 3% de frequência cada um.

Dois micos-leões apresentaram colonização por ambos os clones ST6-t701 e ST188-t189. O ST6-t701, t5271, t7396, foi encontrado predominantemente nos micos-leões que habitavam as ReBios enquanto que o ST188-189 foi mais frequente nos micos-leões que habitavam RPPNs. O ST133 foi obtido de mico-leão que habitava RPPN e o ST2985-189 de micos-leões que habitavam ReBio (figura 14).

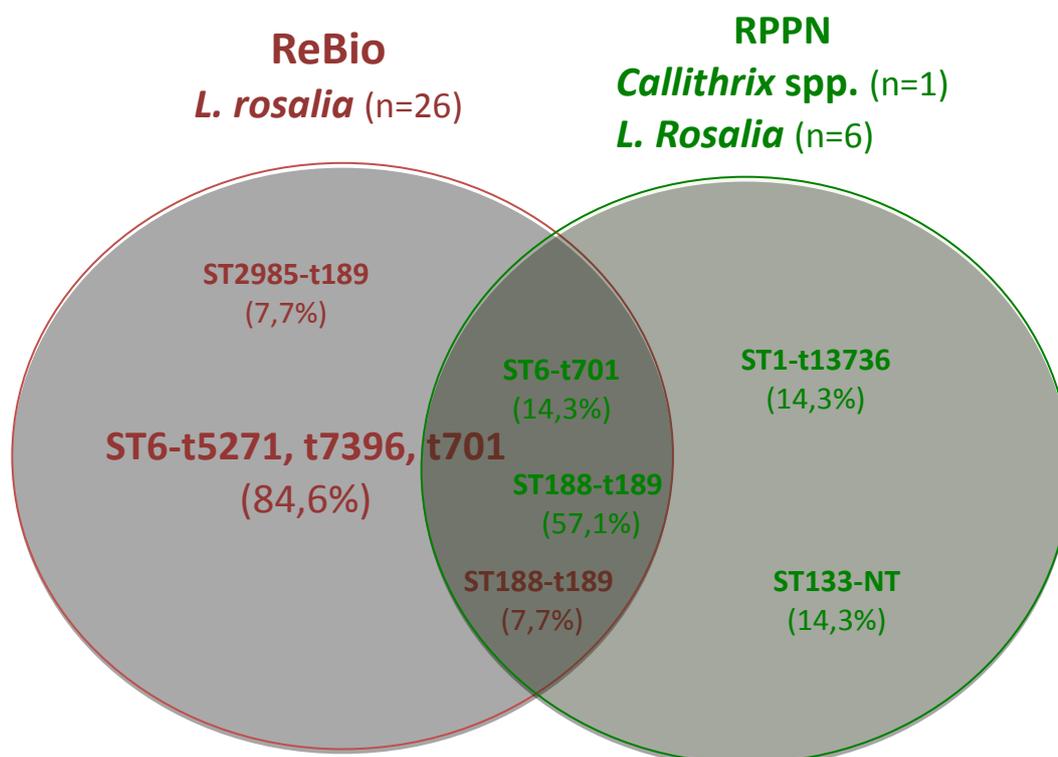


Figura 14: Distribuição dos clones de *S. aureus* isolados de mico-leão-dourado (*L. rosalia*) e híbrido de sagui (*Callithrix* spp.) de vida livre. ReBio: Reserva biológica; RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Nacional; NT: não tipável.

6.4.2 Gel de Eletroforese em Campo Pulsável (PFGE)

A digestão do DNA cromossomal dos isolados de *S. aureus* com a endonuclease *Sma*I e a separação dos fragmentos por PFGE agrupou os isolados em 4 tipos (A, B, C e D). O tipo A correspondeu a 78,8% (26/33) dos isolados sendo composto por 4 subtipos (A1 ao A4), o tipo B correspondeu a 12% (4/33) dos isolados, composto por 3 subtipos (B1 ao B3), o tipo C incluiu 2 isolados e o tipo D foi composto por um isolado.

O perfil de restrição dos isolados revelou uma maior homogeneidade dos clones ST6 que foram todos agrupados no PFGE tipo A (subtipos A1, A2 e A4) e uma menor homogeneidade do clone ST188 que foi agrupado nos PFGE tipos B e

C. O clone ST1 apresentou correlação com o clone ST2985 e foram agrupados no PGE tipo A subtipo A3. O clone ST133 correspondeu ao PFGE tipo D (figura 15). A análise do PFGE dos isolados de CoNS revelou diferentes perfis de restrição intraespécies (figuras 16 a 19).

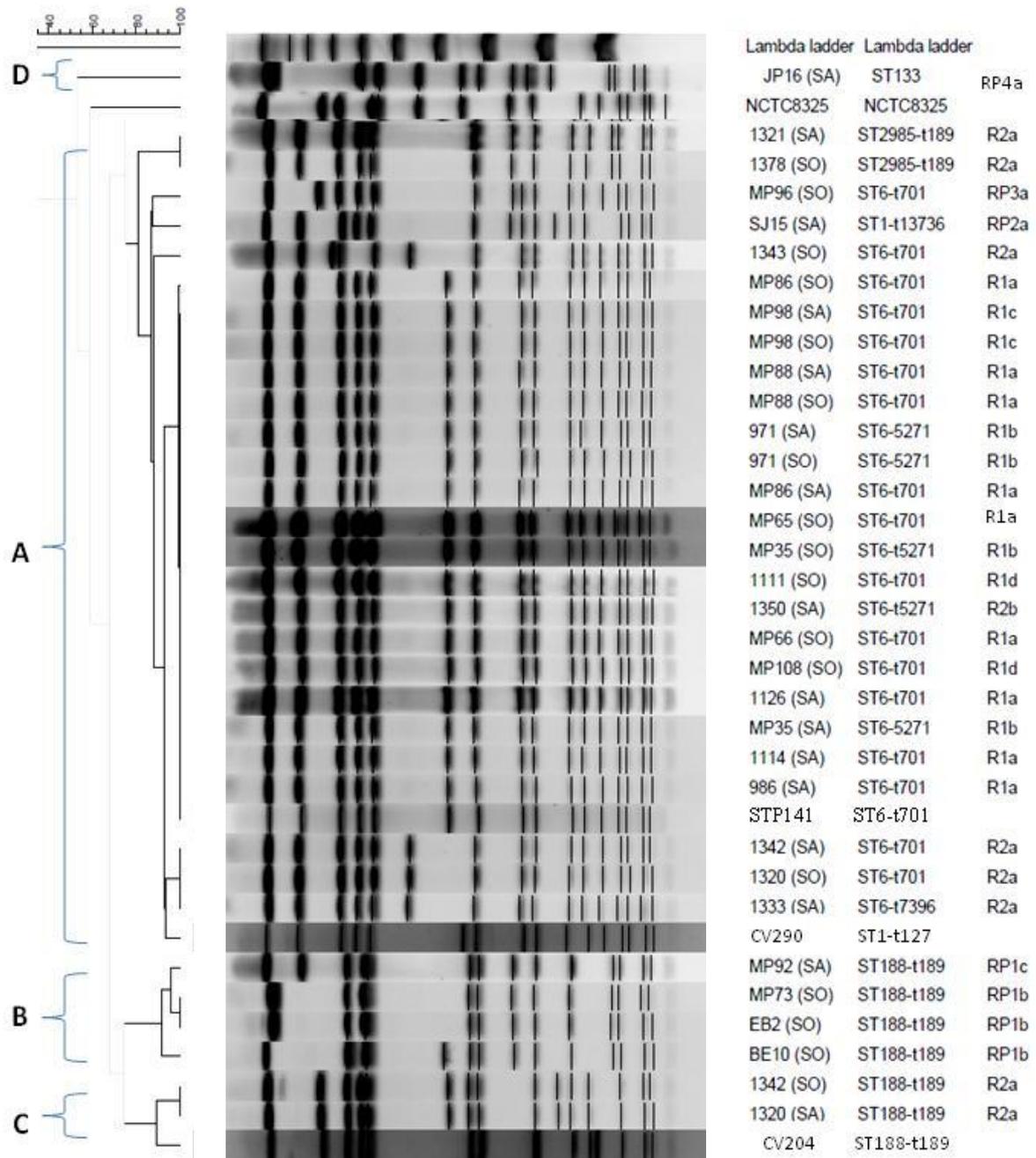


Figura 15: Perfis de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. aureus* com a endonuclease *Sma*I. SO: suabe oral, SA: suabe anal; R: Reserva biológica, RP: Reserva Particular do Patrimônio Nacional, a,b,c,d: grupos dos PNH.

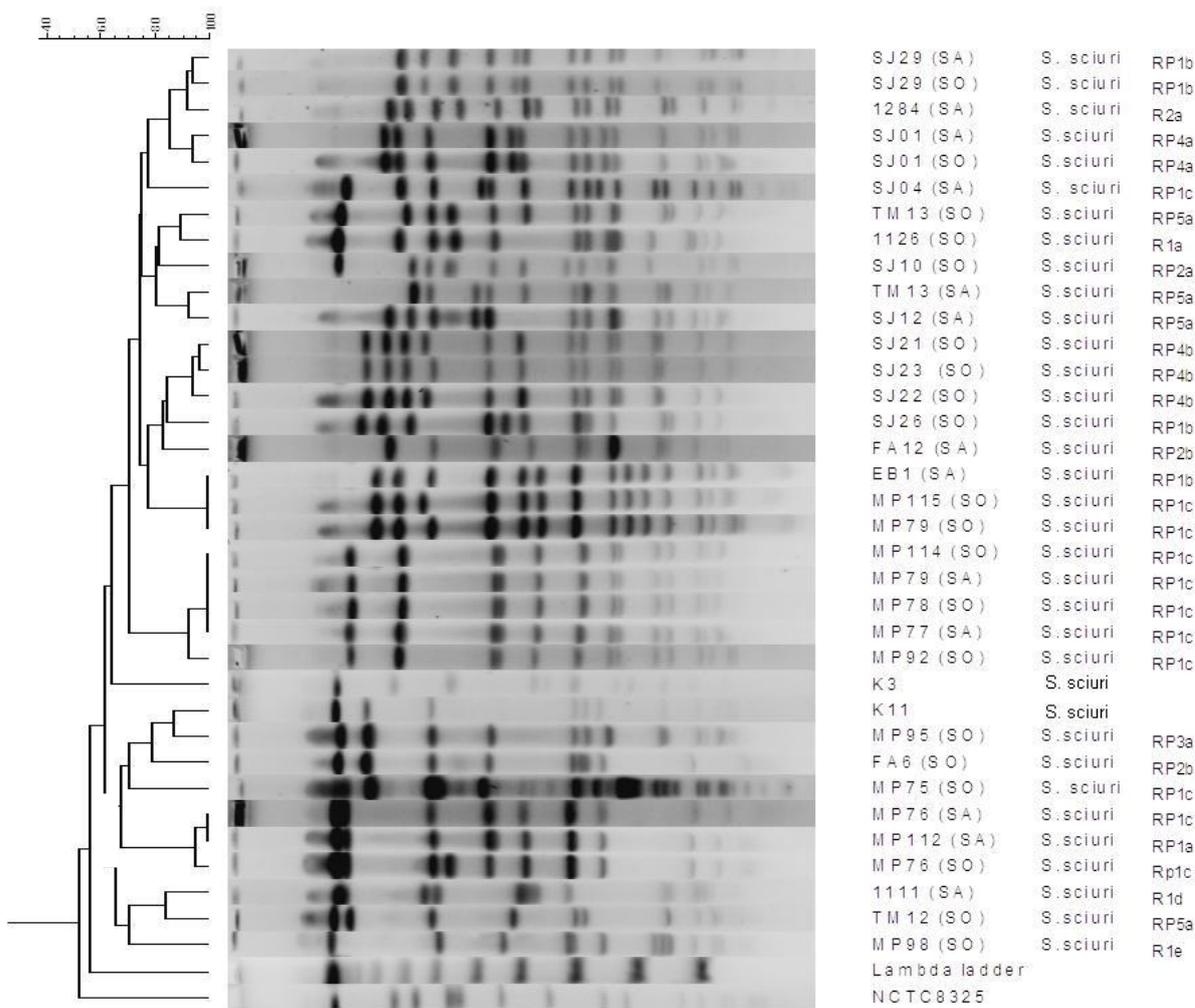


Figura 16: Perfis de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. sciuri* com a endonuclease *Sma*I. SO: suabe oral, AS: suabe anal; R: Reserva biológica, RP: Reserva Particular do Patrimônio Nacional, a,b,c,d: grupos dos PNH.

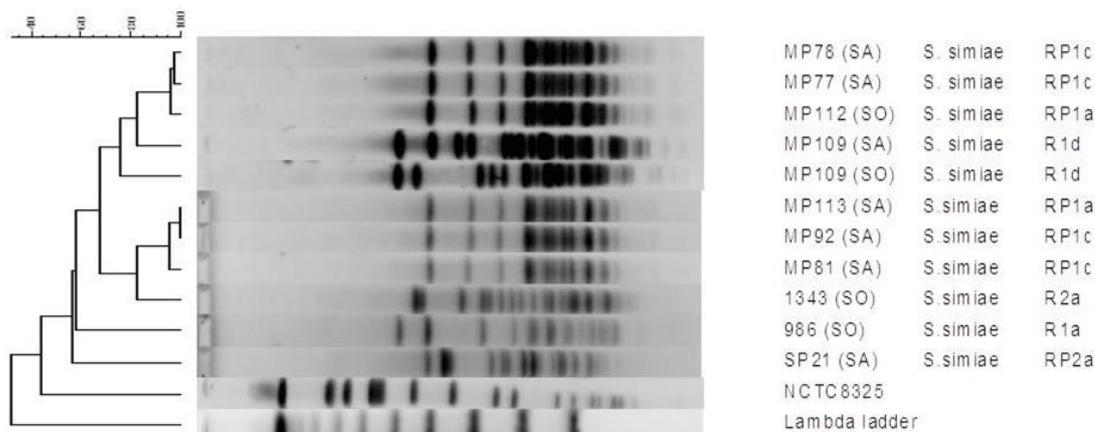


Figura 17: Perfis de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. simiae* com a endonuclease *Sma*I. SO: suabe oral, AS: suabe anal; R: Reserva biológica, RP: Reserva Particular do Patrimônio Nacional, a,b,c,d: grupos dos PNH.

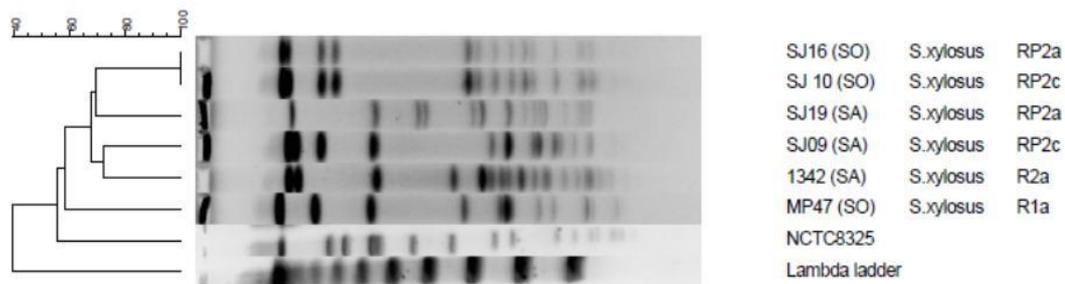


Figura 18: Perfis de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. xylosois* com a endonuclease *Sma*I. SO: suabe oral, SA: suabe anal; R: Reserva biológica, RP: Reserva Particular do Patrimônio Nacional, a,b,c,d: grupos dos PNH.



Figura 19: Perfis de restrição do DNA cromossomal dos isolados de *S. saprophyticus* com a endonuclease *Sma*I. SO: suabe oral, SA: suabe anal; R: Reserva biológica, RP: Reserva Particular do Patrimônio Nacional, a,b,c,d: grupos dos PNH.

6.4.3 Detecção de genes de fatores de resistência e de virulência

Todos os isolados de *S. aureus* são MSSA, pois foram sensíveis a oxacilina no teste de difusão em disco e no Etest e não foram encontrados os genes *mecA* e *mecC* na PCR e no Southern blotting (figuras 20 e 21). Nos CoNS que apresentaram resistência a oxacilina, a penicilina e ao ácido fusídico também não foram encontrados os genes *mecA*, *mecC*, *blaZ*, *fusB* e *fusC*. Contudo, a comparação das sequências amplificadas por PCR (figura 22) da região do promotor do gene *mecA1* dos isolados de *S. sciuri* com a sequência da estirpe *S. sciuri* K11 utilizada como modelo, revelou alterações pontuais relacionadas à substituição de nucleotídeos ao longo das sequências.

Com relação aos fatores de virulência, todos os clones ST6, ST2985, ST188 e ST1 carregavam os genes das leucocidinas LukE e LukD e das hemolisinas gamma variante e beta, o que corresponde a 97% (32/33) dos isolados de *S. aureus*. O clone ST133 carregava apenas o gene da hemolisina beta. 12,2% (5/41) dos isolados carregavam o gene da leucocidina PVL sendo que 4 isolados foram obtidos de micos-

leões que ocorrem em RPPNs. Não foram detectados genes de virulência nos CoNS. As figuras 22 a 24 mostram a amplificação dos genes de fatores de virulência encontrados nos isolados de *S. aureus*.

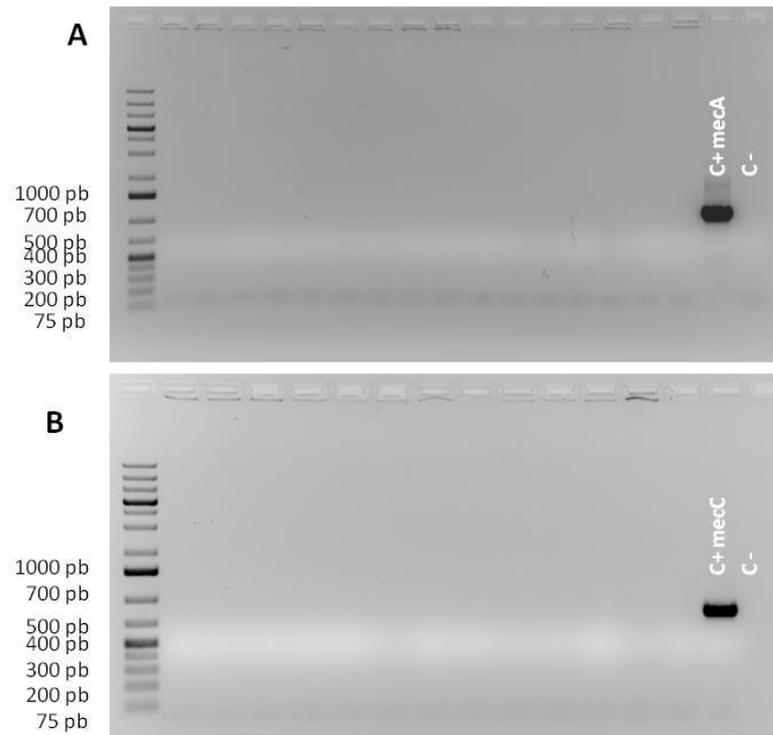


Figura 20: Ausência de amplificação por PCR de genes de resistência. A: gene *mecA*, B: gene *mecC*, C+: controle positivo, C-: controle negativo.

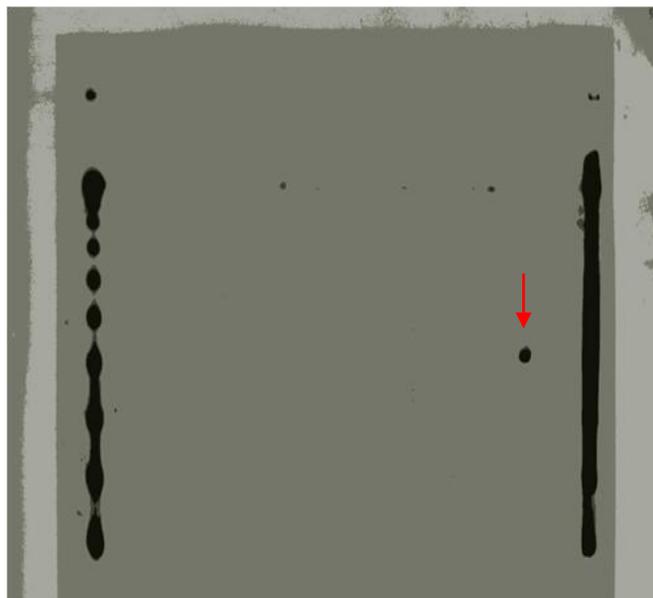


Figura 21: Ausência de hibridação com sonda do gene *mecA* em gel de PFGE. Seta vermelha: controle positivo.

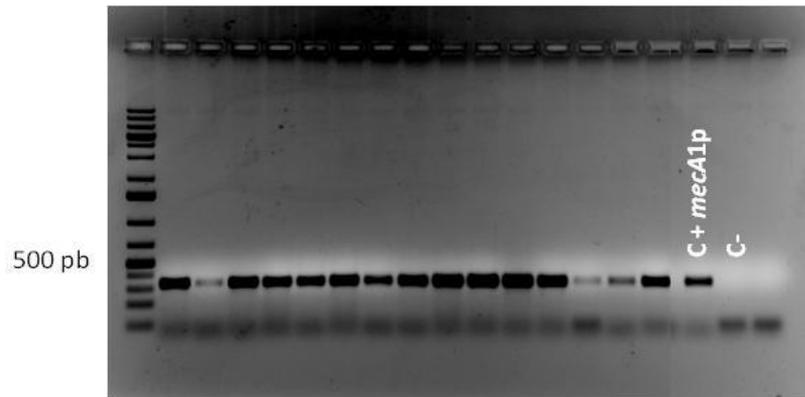


Figura 22: Amplificação por PCR uniplex da região do promotor do gene *mecA1* de *S. sciuri*. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

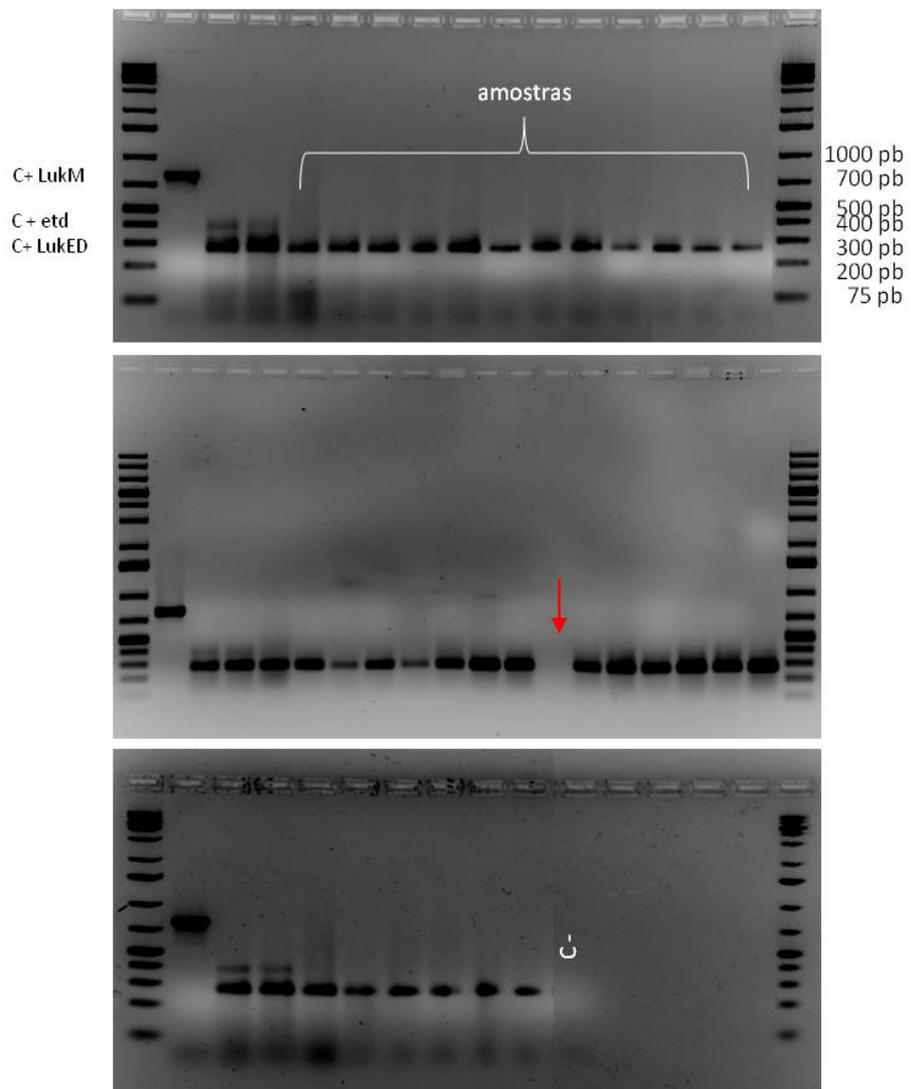


Figura 23: Amplificação por PCR multiplex das leucocidinas LukE-D nos clones de *S. aureus*. Seta vermelha: ausência de amplificação no clone ST133. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

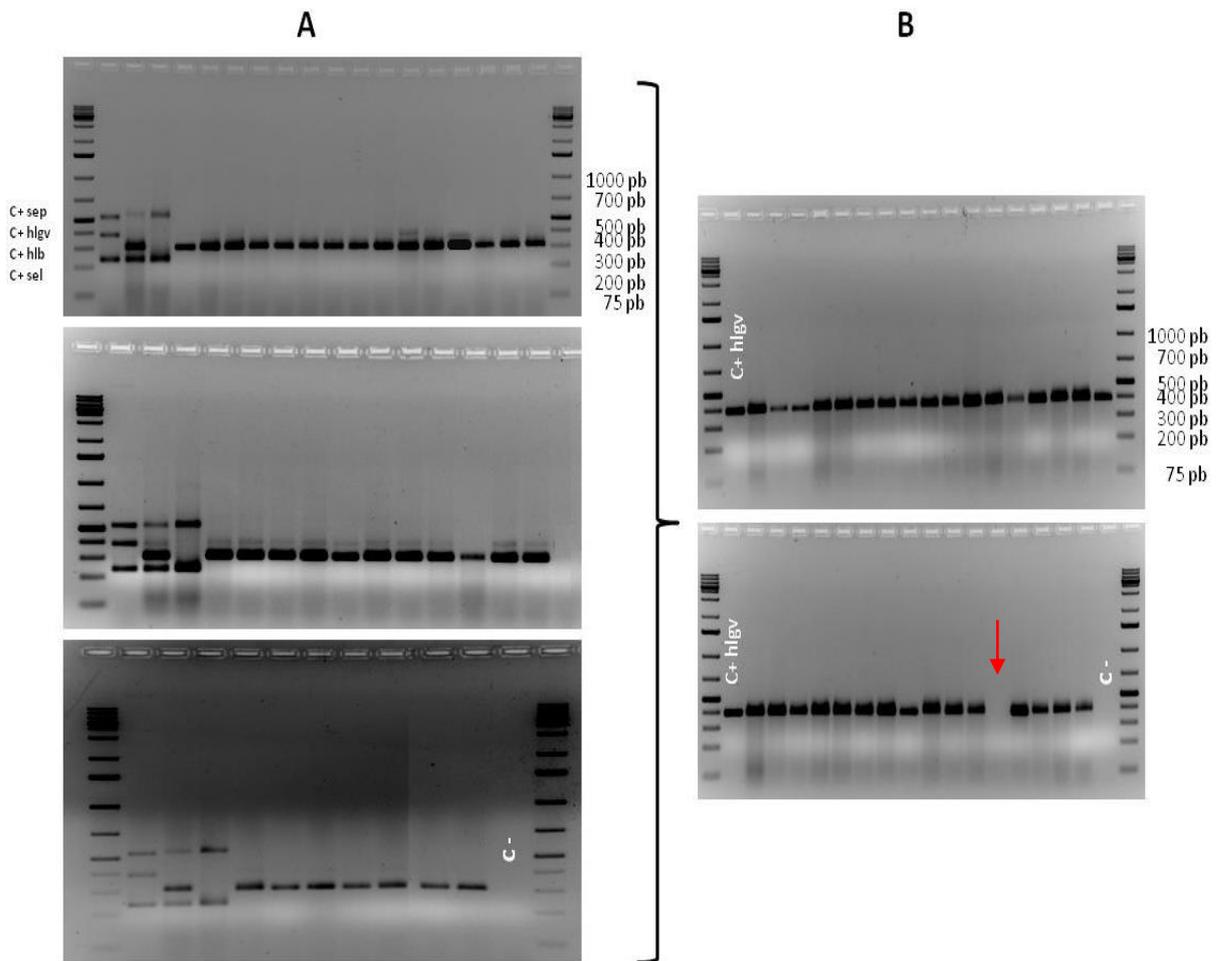


Figura 24: Amplificação através de PCR multiplex de hemolisinas nos clones de *S. aureus*. A: amplificação da hemolisina beta (hlyB); B: amplificação da hemolisina gama variante (hlyGV). A seta vermelha indica a ausência de amplificação da hlyGV do clone ST133. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

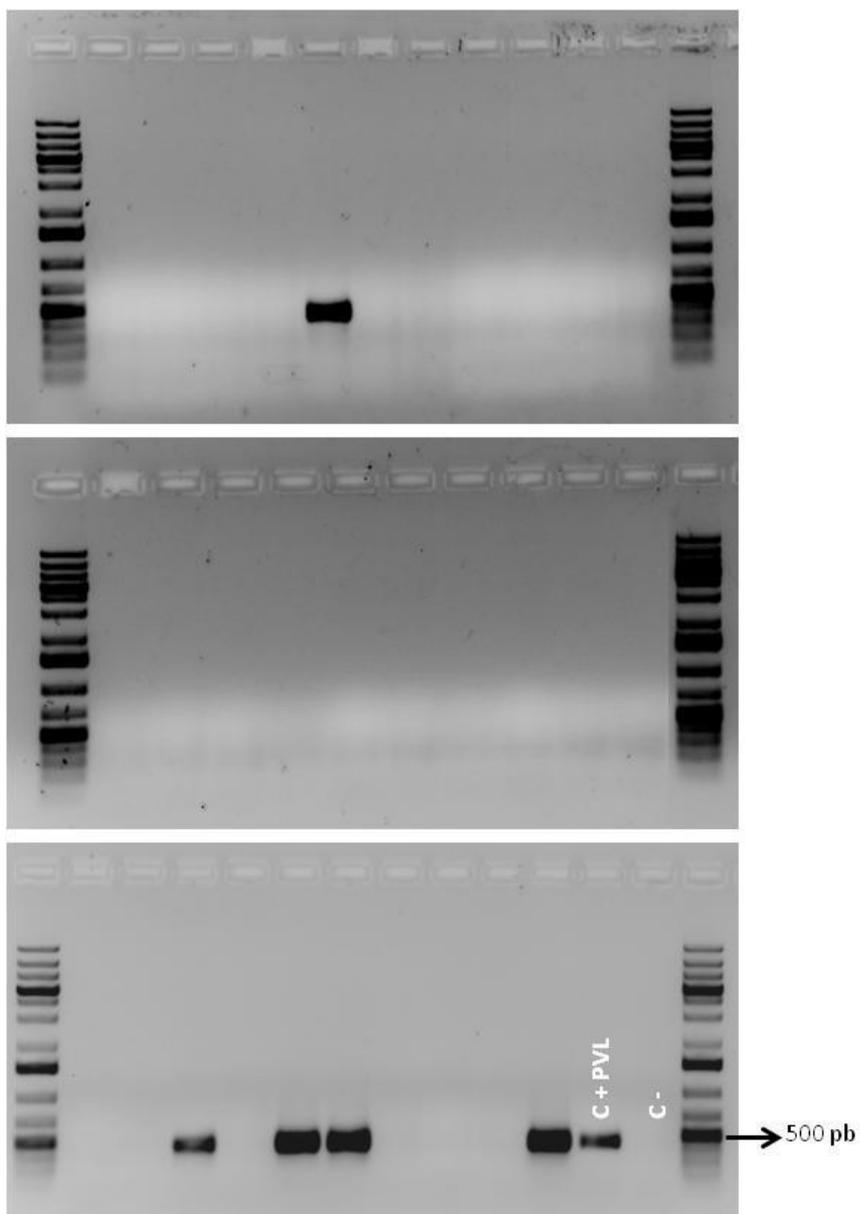


Figura 25: Amplificação através de PCR uniplex da leucocidina Panton-Valentine (PVL) nos clones de *S. aureus*. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

7. DISCUSSÃO

Apesar de o Brasil ser o país que possui a maior diversidade de espécies de PNH no mundo (COSTA *et al.*, 2005) pouco se sabe sobre a microbiota bacteriana dos PNH brasileiros (HOPKINS & NUNN, 2007).

Em PNH, a infecção por *S. aureus* pode ocasionar septicemia, abscessos, estomatite, artrite, miocardite, meningoencefalite, aerosaculite e pneumonia (GARCIA *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012; NAGEL *et al.*, 2013; DICK *et al.*, 2014), porém, as características genéticas dos *S. aureus* patogênicos isolados desses animais ainda são pouco exploradas e grande parte das informações existentes sobre a patogenicidade de clones de *S. aureus* em PNH é restrita a animais criados em cativeiro.

No presente trabalho, foi avaliado o background genético de 33 isolados de *S. aureus* de dois gêneros de PNH endêmicos do Brasil, *Callithrix* e *Leontopithecus*, o que possibilitou a identificação de 5 spa-types e 5 STs sendo um ST (ST2985) inédito e depositado na base de dados do MLST de *S. aureus* (acesso: <http://saureus.mlst.net/sql/fulldetails.asp?id=5498&send=11>). Os clones de *S. aureus* ST6-t701, t5271, t7396, ST188-189, ST2985-189 e ST133 foram isolados apenas em micos-leões e o ST1-t13736 correspondeu ao único isolado de *S. aureus* obtido de sagui. Schaumburg *et al.* (2013) também isolaram diferentes linhagens de *S. aureus* de lêmures e chimpanzés selvagens incluindo clones ST1 e ST188-t189. Cabe citar que, os clones de *S. aureus* mais frequentemente encontrados nos PNH analisados, o ST6 e o ST188, não fazem parte dos clones comumente relatados em humanos e em outros animais no Brasil (AIRES-DE-SOUSA *et al.*, 2007; LAMARO-CARDOSO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012).

Quatro espécies de CoNS também foram encontradas: *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. simiae*, sendo que esta última espécie foi encontrada apenas em micos-leões-dourados. De acordo com a revisão bibliográfica realizada, os relatos da ocorrência de *S. simiae* são restritos ao mico de cheiro (*S. sciureus*) (PANTŮČEK *et al.*, 2005) sendo, portanto, este o primeiro relato da ocorrência desta bactéria em outra espécie de PNH. Estudos moleculares indicam que o *S. simiae* é muito próximo filogeneticamente do *S. aureus* e, provavelmente, essas duas espécies possuem um ancestral comum (SUZUKI *et al.*, 2012).

A colonização e/ou infecção por estafilococos resistentes a meticilina é relatada em PNH (KOLAPPASWAMY *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011) porém, os clones de *S. aureus* encontrados no presente estudo são MSSA e foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Nossos resultados corroboram com os achados de Schaumburg *et al.* (2012), que também não encontraram MRSA em diferentes espécies de PNH africanos ocorridos em vida livre contudo, relatos de resistência à penicilina em *S. aureus* isolados de chimpanzés e lêmures de vida livre foram encontrados (SCHAUMBURG *et al.*, 2013).

Por outro lado, os CoNS isolados no presente estudo, apresentaram altos níveis de resistência para a oxacilina, ácido fusídico e penicilina, correspondendo a 73%, 63% e 17% de resistência, respectivamente. Igualmente, Da Silva *et al.* (2013) também relatam uma alta resistência a penicilina, oxacilina e ácido fusídico em estafilococos isolados da mucosa vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) mantidos em cativeiro. Todavia, os mecanismos que desencadeiam a resistência a antimicrobianos em animais selvagens de vida livre ainda são pouco compreendidos (RADHOUANI *et al.*, 2014).

Sete isolados de *S. sciuri* pertencentes a 4 saguis e 3 micos-leões, todos oriundos de RPPNs, apresentaram multirresistência a penicilina, oxacilina e ácido fusídico. Kolappaswamy *et al.* (2008) também relatam a infecção por uma cepa de *Staphylococcus* não-*aureus* multirresistente em um exemplar de macaco rhesus (*Macaca mulatta*) que desenvolveu dermatite aguda generalizada após ser exposto a radiação gama durante experimento. Os autores sugerem que essa cepa fazia parte da microbiota do animal, porém uma imunossupressão ocasionada pela radiação pode ter sido a causa do desenvolvimento da infecção. Multirresistências também são relatadas em diferentes clones de *S. aureus* isolados de PNH do velho mundo (LEE *et al.*, 2011; SCHAUMBURG *et al.*, 2012; NAGEL *et al.*, 2013).

O tratamento com antimicrobianos, a transmissão de isolados resistentes de humanos e a imunossupressão são citados como possíveis causas da colonização ou da infecção de PNH mantidos em cativeiro por estafilococos resistentes a antimicrobianos (KOLAPPASWAMY *et al.*, 2008; SCHAUMBURG *et al.*, 2012). Schaumburg *et al.* (2012) analisaram a resistência a antibióticos e a estrutura da população de *S. aureus* isolados de chimpanzés africanos selvagens e de cativeiro e concluíram que os chimpanzés cativos eram mais frequentemente colonizados com

linhagens de *S. aureus* associadas a humanos e que estas foram mais resistentes a antibióticos quando comparadas às linhagens isoladas dos chimpanzés selvagens.

Em PNH neotropicais, Lilenbaum *et al.* (2006) encontraram resistência em 88% dos estafilococos recuperados da vagina de micos-leões (*Leontopithecus* spp.) mantidas em cativeiro no Brasil, sendo que a penicillina foi o antibiótico que teve maior número de isolados resistentes. Resistência à penicilina e à oxacilina também é relatada em *Staphylococcus aureus* e não-*aureus* isolados de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em zoológico no Brasil (AIPS *et al.*, 2003).

Com relação à pesquisa de genes de virulência e de resistência, em nenhum isolado foram encontrados genes de enterotoxinas e de exfoliatinas e, os genes *mecA*, *mecC* e *blaZ* também não foram detectados nos isolados de CoNS que mostraram-se resistentes a oxacilina e a penicilina. Porém, houve amplificação de genes de leucocidinas e hemolisinas na maioria dos isolados de *S. aureus*, com destaque para a presença do gene da PVL em 5 isolados, sendo 4 isolados pertencentes ao clone ST188 encontrado em micos-leões-dourados que ocorrem em uma mesma RPPN e 1 isolado pertencente ao clone ST1 encontrado em um sagui que ocorre em uma RPPN diferente. Schaumburg *et al.* (2012a) descrevem a ocorrência de PVL em MSSA ST80 e ST2178 isolados de chimpanzés mantidos em cativeiro e Schaumburg *et al.* (2013) encontraram genes de enterotoxinas e de exfoliatinas em *S. aureus* isolados de chimpanzés e lêmures de vida livre.

Estudos recentes têm sugerido que o gene *mecA1/pbpD* presente em algumas espécies de CoNS como, o *S. sciuri*, seja o precursor evolutivo do gene *mecA* entretanto, ainda não são conhecidas as pressões ambientais que conduziram a evolução de um determinante de resistência e como o mesmo foi transferido para o *S. aureus* (ROLO *et al.*, 2014).

As comparações da sequência do promotor do gene *mecA1* dos *S. sciuri* isolados com a sequência do promotor do gene da estirpe *S. sciuri* K11, utilizada como modelo, revelaram a presença de alterações, caracterizadas principalmente pela substituição de nucleotídeos ao longo das sequências. Estudos demonstram que alterações específicas na região do promotor do gene *mecA1* resultam em uma superexpressão do gene conferindo resistência a meticilina (FREY *et al.*, 2013). Esse fenômeno pode ser a causa das resistências a oxacilina que foram observadas no presente estudo.

De acordo com Van Den Berg *et al.* (2011) uma baixa detecção de genes de virulência e de resistência em isolados de *S. aureus* de PNH pode ser explicada pelo fato de que os primers utilizados foram desenhados para cepas de *S. aureus* isolados de humanos.

Por outro lado, é importante considerar também que as análises moleculares realizadas foram direcionadas para a detecção de elementos genéticos móveis de resistência sendo que, a ausência da detecção desses elementos, pode indicar que as resistências observadas são determinadas por mutações genômicas, contudo é necessária a realização de análises moleculares mais profundas, como o sequenciamento completo do genoma (Whole-Genome Sequencing), para verificar esta hipótese.

No tocante à colonização por estafilococos nas espécies de PNH estudadas, foi encontrada uma baixíssima ocorrência de *S. aureus* na espécie exótica. Por outro lado, a ocorrência de *S. aureus* foi significativamente maior entre micos-leões que habitam as reservas. Além disso, foi verificada uma maior ocorrência de CoNS em saguis e em micos-leões que convivem em áreas com a espécie invasora quando comparado com os micos-leões que não convivem contudo, a análise do perfil de restrição dos isolados sugere que não há disseminação cruzada de CoNS entre indivíduos da espécie invasora e da espécie nativa.

Os CoNS são considerados importantes patógenos oportunistas em humanos e animais (CUNHA *et al.*, 2007, FREY *et al.*, 2013). Cabe ainda citar, que os CoNS isolados em micos-leões de RPPN apresentaram mais resistência a antimicrobianos do que os isolados de micos-leões que habitam reservas, entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis pelas resistências observadas. Sendo assim, os resultados do presente estudo comprovam que PNH neotropicais em vida livre são colonizados por CoNS resistentes a antibióticos que possuem mecanismos moleculares de resistência possivelmente diferentes dos mecanismos descritos em estafilococos de humanos.

Adicionalmente, diferentes clones de *S. aureus* que carregam genes de toxinas como hemolinas e leucocidinas também fazem parte da microbiota gastrointestinal desses animais. Portanto, mais estudos de caracterização molecular de estafilococos de PNH neotropicais de vida livre são importantes para a compreensão do papel desses animais como reservatórios de estafilococos potencialmente patogênicos para outros animais e para o homem.

8. CONCLUSÃO

- Micos-leões-dourados e híbridos de saguis em vida livre são colonizados por diferentes espécies de estafilococos, com diferenças na ocorrência das espécies (*S. aureus* mais frequente em micos e *S. simiae* ausente em saguis);
- Foi isolado pela primeira vez *Staphylococcus simiae* em mico-leão-dourado;
- Foi identificado pela primeira vez um ST (ST2985) de *Staphylococcus aureus* inédito em mico-leão-dourado;
- Os tipos clonais de *S. aureus* mais frequentes em mico-leão-dourado de vida livre são ST6 e ST188, sendo esses clones portadores de genes de toxinas como leucocidinas e hemolisinas;
- Os *S. aureus* presentes na microbiota gastrointestinal de PNH neotropicais de vida livre são sensíveis a antimicrobianos, contudo CoNS apresentam maior grau resistência a antibióticos, incluindo a oxacilina;
- Não foi observado o compartilhamento de espécies de estafilococos entre a espécie nativa e a espécie invasora.

9. REFERÊNCIAS

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.E.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.C.; SILVA, D.A.; DE LENCASTRE, H. characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro state, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.12, p.3845-3849, 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004. 1. ed. Editora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Brasil, p. 356-381.

ASPIS, D.; BALDASSI, L.; GERMANO, P. M. L.; FEDULLO, J. D.L.; DE CAMARGO PASSOS, E.; DE ANDRADE GONÇALVES, M. Suscetibilidade in vitro a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* spp e *Micrococcus* spp isoladas a partir de mucosa oral de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, n.40 (supl.), p.83-89, 2003.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, n.45, p.493-496, 1966.

BROWN, L.R.; HANDLER, S.; ALLEN, S.S.; SHEA, C.; WHEATCROFT, M.G.; FROME, W.J. Oral microbial profile of the marmoset. **Journal of Dental Research**, v.52, n.4, p.815-822, 1973.

CHUNG, M.; DE LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; AIRES DE SOUSA, M. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. **Microb Drug Resist**, v.6, p.189-198, 2000.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing**. Twenty-first Informational Supplement M100-S21. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.

COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; MENDES, S.L.; DITCHFIELD, A.D. Mammal Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, n.19, p.672-679, 2005.

COSTA, T.M.; VIEIRA, V.; ALVES, F.A. Update on major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonizing and/or infecting humans and its distribution in Brazil. **Cadernos UniFOA**, edição n.19, Agosto/2012, p.93-105.

COUTINHO, J.F.V.; ARACI, D.; LIRNA, A.M.T. SILVA, M.S.B.F.; BONFIM, W.M.; BARROS, V.L.R.S.; DA COSTA, P.F. Investigação etiológica de uma epizootia em saguis (*Callithrix jacchus*) numa área indene para febre amarela. **A Primatologia no Brasil**, v.10, p.26-268, 2007.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JR, J.P. detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

DA SILVA, G.A.; MONTEIRO, F.O.B.; DIAS, H.L.T.; CAVALCANTE, R.D.O.; SAMPAIO, A.D.F.; DA CONCEIÇÃO, M.E.B.A.M.; ... & RAHAL, S.C. Qualitative analysis of preputial and vaginal bacterial microbiota in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) raised in captivity. **Journal of Medical Primatology**, v.42, n.2, p.71-78, 2013.

DE LENCASTRE, H., COUTO, I.; SANTOS, I.; MELO-CRISTINO, J.; TORRES-PEREIRA, A.; TOMASZ, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n.13, p.64-73, 1994.

DICK, E.J.; OWSTON, M.A.; DAVID, J. M.; SHARP, R.M.; ROUSE, S.; HUBBARD, G.B. Mortality in captive baboons (*Papio* spp.): a 23-year study. **Journal of Medical Primatology**, v.43, n.3, p.169-196, 2014.

ENRIGHT, M.C.; DAY, N.P.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** n.38, p.1008-1015, 2000.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Version 4.0, 2014. <<http://www.eucast.org>>. Download em: **03 February 2015**.

FARIA, N.A.; CARRICO, J.A.; OLIVEIRA, D.C.; RAMIREZ, M.; DE LENCASTRE, H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, n.46, p.136-144, 2008.

FREY, Y.; RODRIGUEZ, J.P.; THOMANN, A.; SCHWENDENER, S.; PERRETEN, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.4, p.2247-2257, 2013.

GARCÍA, A.; NAMBIAR, P.R.; MARINI, R.P.; FOX, J.G. Staphylococcal meningoencephalitis, nematodiasis, and typhlocolitis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Journal of Medical Primatology**, v.38, n.5, p.377-381, 2009.

HOPKINS, M.E.; NUNN, C.L.A. Global gap analysis of infectious agents in wild primates. **Diversity and Distributions**, n.13, p. 561–572, 2007. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00364.x

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between

Staphylococcus aureus genetic background virulence factors agr groups (alleles) and human disease. **Infection and Immunology**, v.70, n.2, p.631-641, 2002.

KIM, C.; MILHEIRIÇO, C.; GARDETE, S.; HOLMES, M.A.; HOLDEN, M.T.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.44, p.36854-36863, 2012.

KLOOS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Reviews in Microbiology**, v.34, n.1, p. 559-592, 1980.

KOLAPPASWAMY, K.; SHIPLEY, S.T.; TATAROV, I.I.; DETOLLA, L.J. Methicillin-resistant *staphylococcus non-aureus* infection in an irradiated rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.47, n.3, p. 64-67, 2008.

KUMAR, S.; FOX, B.; OWSTON, M.; HUBBARD, G. B.; DICK, E.J. Pathology of spontaneous air sacculitis in 37 baboons and seven chimpanzees and a brief review of the literature. **Journal of Medical Primatology**, v.41, n.4, p.266-277, 2012.

LAMARO-CARDOSO, J.; DE LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; OLIVEIRA, L.S.C.; OLIVEIRA, R.M.; NOUER, S.S.; AIRES-DE-SOUSA, M.; MILHEIRIÇO, C.; ANDRADE, A.L.S. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n.12, p. 3991-3997, 2009.

LEE, J.I.; KIM, K.S.; OH, B.C.; KIM, N.A.; KIM, I.H.; PARK, C.G.; KIM, S.J. Acute necrotic stomatitis (noma) associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a newly acquired rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v.40, n.3, p.188-193, 2011.

LILENBAUM, W.; MORAES, I.A.; CARDOSO, V.S.; VARGES, R.G.; FERREIRA, A.M.R.; PISSINATTI, A. Antibiotic resistance in *Staphylococci* isolated from the vaginas of captive female *Leontopithecus* (Callitrichidae-Primates). **American Journal of Primatology**, v.68, n.8, p.825-831, 2006.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; KE, D.; PARADIS, S.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2541-2547, 2001.

MCLAWS, F.; CHOPRA, I.; O'NEILL, J. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.61, p.1040-1043, 2008.

MILHEIRIÇO, C.; PORTELINHA, A.; KRIPPAHL, L.; DE LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.C. Evidence for a purifying selection acting on the β -lactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 11, n.1, p.76-80, 2011.

MONDAY, S.R.; BOHACH, G.A Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3411-3414, 1999.

MUGISHA, L.; KÖNDGEN, S.; KADDU-MULINDWA, D.; GAFFIKIN, L.; LEENDERTZ, F.H. Nasopharyngeal colonization by potentially pathogenic bacteria found in healthy semi-captive wild-born chimpanzees in Uganda. **American Journal of Primatology**, v.76, n.2, p.103-110, 2014.

NAGEL, M.; DISCHINGER, J.; TÜRCK, M.; VERRIER, D.; OEDENKOVEN, M.; NGOUBANGOYE, B.; ... & GONZALEZ, J.P. Human-associated *Staphylococcus aureus* strains within great ape populations in Central Africa (Gabon). **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.11, p.1072-1077, 2013.

OLIVEIRA, D.C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.7, p.2155-2161, 2002.

PANTŮČEK, R.; SEDLACEK, I.; PETRAS, P. KOUKALOVÁ, D.; ŠVEC, P.; STETINA, V.; VANCANNEYT, M.; CHRASTINOVA, L.; VOKURKOVA, J.; RUŽIČKOVÁ, V.; DOSKAR, J.; SWINGS, J.; HÁJEK, V. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.55, p.1953-1958, 2005.

POULSEN, A.B.; SKOV, R.; PALLESEN, L.V. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.2, p.419-421, 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London, England, 1994. 648 p.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in microbiology**, v.5. doi:10.3389/fmicb.2014.00023, 2014.

ROLO, J.; DE LENCASTRE, H.; MIRAGAIA, M. High frequency and diversity of cassette chromosome recombinases (ccr) in methicillin-susceptible *Staphylococcus sciuri*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 69, p.1461-1469, 2014.

SCHAUMBURG, F.; ALABI, A.S.; KÖCK, R.; MELLMANN, A.; KREMSNER, P.G.; BOESCH, C.; BECKER, K.; LEENDERTZ, F.H.; PETERS, G. Highly divergent *Staphylococcus aureus* isolates from African non-human primates. **Environmental Microbiology Reports**, n.4, p.141-146, 2012.

SCHAUMBURG, F.; MUGISHA, L.; PECK, B.; BECKER, K.; GILLESPIE, T. R.; PETERS, G.; LEENDERTZ, F. H. Drug-resistant human *Staphylococcus aureus* in sanctuary apes pose a threat to endangered wild ape populations. **American Journal of Primatology**, v.74, n.12, p.1071-1075, 2012a.

SCHAUMBURG, F.; MUGISHA, L.; KAPPELER, P.; FICHTEL, C.; KÖCK, R.; KÖNDGEN, S.; ... & LEENDERTZ, F. Evaluation of non-invasive biological samples to monitor *Staphylococcus aureus* colonization in great apes and lemurs. **PloS one**, 8:10, e78046, 2013.

SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; MONTGOMERY, S.O.; SMITH, D.H.; WADDINGTON, M., DODGE, D.E.; KREISWIRTH, B.N. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3556-3563, 1999.

SUZUKI, H.; LEFÉBURE, T.; BITAR, P.P.; STANHOPE, M.J. Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. **BMC Genomics**, 13:38, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre, 10. ed. Artmed, 2012, 877p.

VAN DEN BERG, S.; VAN WAMEL, W.J.; SNIJDERS, S.V.; OUWERLING, B., DE VOGEL, C.P.; BOELEN, H.A.; ... VAN BELKUM, A. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are natural hosts of specific *Staphylococcus aureus* lineages. **PloS one**, 6:10, e26170, 2011.

APÊNDICE A - Dados clínicos e amostrais

Localidade: _____

Grupo: _____ Data: _____

Espécie: () *C. jacchus* () *C. penicillata* () *híbrido* () *L. rosalia*

Tatuagem: _____ Peso: _____

Sexo: () Macho () Fêmea

Idade: () adulto () jovem () filhote

Dados Clínicos:

Temperatura retal: _____

Amamentação: () sim () não

Mucosas: Lesões: () não () sim

Material coletado:

() swab anal () swab oral () fezes SAF () sangue () esfregaço sanguíneo

() ectoparasita () raspado pele

OBS: _____

Apêndice B: Lista dos primers utilizados.

Gene	Primers	Sequencia	Tamanho (pb)	Controle positivo
<i>spa</i>	Spa F2	GAACAACGTAACGGCTTCATCC	500	<i>S aureus</i> ATCC 25923
	Spa R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGC		
<i>nuc</i>	nuc-1	TCAGCAAATGCATCACAAACAG		
	nuc-2	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG		
<i>tuf</i>	TStaG422	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATC	370	
	TStaG765	TIACCATTTCAGTACCTTCTGGTAA		
<i>Sea</i>	Sea F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	520	<i>S aureus</i> FRI913
	Sea R	GTTCTGTAGAAGTATGAAACAGG		
<i>Seb</i>	Seb F	ATGTAATTTTGATATTCGCAGTG	643	<i>S aureus</i> FRI913
	Sec R	TGCAGGCATCATATCATACCA		
<i>Sec</i>	Sec F	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	238	<i>S aureus</i> FRI913
	SecR	TGCAGGCATCATATCATACCA		
<i>Seh</i>	Seh F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	360	<i>S aureus</i> FRI569
	Seh R	GTCGAATGAGTAATCTCTAGG		
<i>Sej</i>	Sej F	CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG	142	<i>S aureus</i> FRI472
	Sej R	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC		
<i>16S rRNA</i>	16S F	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC	228	-
	16S R	CGC ACA TCA GC GTC AG		
<i>Sed</i>	Sed F	GTGGTCAAATAGATAGGACTGC	384	<i>S aureus</i> FRI472
	Sed R	ATATGAAGGTGCTCTGTGG		
<i>Seg</i>	Seg F	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	327	<i>S aureus</i> FRI472
	Seg R	CCAAGTGATTGTCTATTGTCG		
<i>See</i>	See F	TACCAATTAACCTGTGGATAGAC	170	<i>S aureus</i> FRI913
	See R	CTCTTTGCACCTTACCGC		
<i>Sei</i>	Sei F	CAACTCGAATTTTCAACAGGTAC	465	<i>S aureus</i> FRI472
	Sei R	CAGGCAGTCCATCTCCTG		
<i>SEP</i>	Sep-1	ATCATAACCAACCGAATCAC	148	<i>S aureus</i> FRI913
	Sep-2	AGAAGTAACTGTTTCAGGAGCTA		
<i>SEL</i>	Sel-1	GCGATGTAGGTCCAGGAAAC	234	<i>S aureus</i> FRI913
	Sel-2	CATATATAGTACGA		
<i>Tst</i>	Tst F	GCTTGCACAACCTGCTACAG	559	<i>S aureus</i> FRI913
	Tst R	TGGATCCGTCATTCATTGTTAA		
<i>LuKM</i>	LuKM-1	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC	780	<i>S aureus</i> ATCC 31890
	LuKM-2	GTTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC		
<i>LukE-LukD</i>	Nlukde-1	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG	269	<i>S aureus</i> FRI913

	Nlukde-2	TGTATTTCGATAGCAAAAAGCAGTGCA		
PVL	Npvl-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATC CA	433	<i>S aureus</i> GRE14
	Npvl-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAA AGC		
ETD	Netd-1	AACTATCATGTATCAAGG	358	<i>S aureus</i> TY14
	Netd-2	CAGAATTTCCCGACTCAG		
ETB	Netb-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACAAC	612	<i>S aureus</i> TY4
	Netb-2	AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACT C		
ETA	Neta-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	190	<i>S aureus</i> TC7
	Neta-3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC		
γ -hem	Nhlg-1	GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	<i>S aureus</i> ATCC 49775
	Nhlg-2	CACCAA ATGTATAGCCTAAAGTG		
γ -hem variante	Nhlgv-1	GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390	<i>S aureus</i> RIMD 31092
	Nhlgv-2	ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG		
β -hemol	Nh1b-1	GTGCACCTTACTGACAATAGTGC	309	<i>S aureus</i> NCTC 7428
	Nh1b-2	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
mecA	mecA1	GGTCCCATTAACCTCTGAG	1039	<i>S aureus</i> COL
	mecA2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
mecC	LGA F5	TATAGAGCTCTTGATGACAAAAGGAGG	860	LGA251
	LGA R6	TCTCGAATTCCAAGCACTTAATATCAACGC		
mecA1P	mecA1P F	CATATATATATTTATACGCTCATC	335	<i>S. sciuri</i> K11
	mecA1P R	TTC AAT GGC ATC AAT TGT TTC		
fusB	fusB F	CTATAATGATATTAATGAGATTTTTGG	431	<i>S aureus</i> HFF189
	FusB R	TTTTTACATATTGACCATCCGAATTGG		
fusC	fusC F	TTAAAGAAAAAGATATTGATATCTCGG	332	<i>S aureus</i> HDE288
	FusC R	TTTACAGAATCCTTTTACTTTATTTGG		
blaZ	blaZ F1	GATAAGAGATTTGCCTATGC	533	<i>S aureus</i> HSA74
	blaZ R1	GCATATGTTATTGCTTGACC		
arc	arcC F2	CCTTTATTTGACTCACCAGCG		
	arcC R1	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
aro	aroE F1	ATCGGAAATCCTATTTACATTC		
	aroE R1	GGTGTTGTATTAATAACGATATC		
glp	glpF F1	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC		
	glpF R1	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
gmk	gmk F1	ATCGTTTTATCGGGACCATC		
	gmk R1	TCATTAACTACAACGTAATCGTA		
pta	pta F1	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG		
	pta R1	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA		
tpi	tpi F1	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA		
	tpi R1	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
yqiL	yqiL F1	CAGCATACAGGACACCTATTGGC		
	yqiL R1	CAGCATACAGGACACCTATTGGC		

