

SHANICE SHAMARA FITTEN

"RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ENTEROCOCCUS* SPP.
ISOLADA DE
TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*) DE CAPTURA
INTENCIONAL"



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2023

**Trabalho a ser realizado no
Departamento de Metabolismo
Macromolecular Firmino de Torres
Castro, do Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho - UFRJ, sob a orientação
da Professora Rosane Silva e
coorientação Msc Fernanda Sobral
Short.**

*Este trabalho é dedicado a Ti Deus,
obrigada por me levar até aqui,
Glória ao Teu Nome!*

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus Todo-Poderoso por tudo que Ele tem feito em minha vida. Toda glória e louvor pertencem a Ele, pois ele conhece os pensamentos que tem a meu respeito, planeja me fazer prosperar e não me prejudicar, planeja me dar esperança e um futuro - *Jeremias 29:11*.

Em segundo lugar, tenho grande prazer em agradecer à minha mãe Marlene que lutou muito e muito para me levar até aqui. Às minhas queridas irmãs Sashana e Amoya, agradeço seu apoio e amor. Minha avó Sênior e todos os demais familiares e amigos, obrigado por seu amor e compaixão enquanto enfrentei um dos meus maiores desafios.

Meu querido marido Philip, muito obrigada por seu apoio incomparável, você segurou minha mão em alguns dos meus momentos mais sombrios e por você sou grato.

À minha família da igreja na Jamaica, ao meu círculo de oração que lutou em oração sem cessar para me levar até aqui, muito obrigada. Meu coração está com cada um de vocês por cada oração, sacrifício ou conselho que deram.

Aos meus colegas jamaicanos aqui no Brasil, muito obrigada por serem uma família longe de família. O amor, o apoio e o lembrete constante das minhas capacidades. Sem cada um de vocês concluir minha graduação no Brasil não teria sido possível.

Aos meus amigos africanos que conheci durante o programa de câmbio Pec-g, muito obrigada a todos pela comunidade de amor que todos vocês proporcionaram e por se misturarem bem conosco, jamaicanos, em solidariedade.

A todos os professores e meus colegas do Instituto de Microbiologia, muito obrigada pela sua acomodação e gentileza para comigo.

À Professora Marcia Giambiagi de Marval, sou verdadeiramente grato pelo carinho e gentileza durante meus últimos dias no IMPPG.

Para a professora Rosane Silva, você foi mais que uma orientadora. A senhora assumiu o papel de figura materna e guia. Serei eternamente grato pela paciência e gentileza da senhora. A senhora se preocupou fora do laboratório e por isso agradeço.

À minha coorientadora Fernanda Short, obrigada por todo o auxílio e orientação, também, por me confiar a participação em sua pesquisa.

Um agradecimento especial aos meus amigos de laboratório João e Sara que me ajudaram sempre que estive em crise. Obrigada por serem pacientes e gentil em me ensinar e ouvir tudo o que eu tinha a dizer.

Uma grande obrigada a Thayane e ao Professor Turan por se disponibilizarem a fazer parte do meu comitê TCC, e a Clara por ajudar em meu experimento.

Obrigada a todos os membros do laboratório que me impactaram durante esta jornada de uma forma ou de outra.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

F547r Fitten, Shanice Shamara
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROCOCCUS SPP.
ISOLADA DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*) DE
CAPTURA INTENCIONAL / Shanice Shamara Fitten. --
Rio de Janeiro, 2023.
41 f.

Orientadora: Rosane Silva.
Coorientadora: Fernanda Sobral Short.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Conceito "one health". 2. *Chelonia mydas*. 3.
Enterococcus spp. 4. genes de resistência aos
antimicrobianos. 5. cultivo de bactérias. I. Silva,
Rosane , orient. II. Sobral Short, Fernanda,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Shanice Shamara Fitten

"RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADA DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*) DE CAPTURA INTENCIONAL"

Rio de Janeiro, 14 de Dezembro de 2023 (Data da defesa da Monografia)

Prof. Lúcia Martins Teixeira – IMPPG

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Prof. Raquel Bonelli – IMPPG

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Prof. Turan Urmenyi - IBCCF

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Prof. Márcia Giambiagi de Marval - IMPPG

(Nome do examinador suplente, sua titulação e instituição a que pertence)

RESUMO

Shanice Shamara Fitten

"RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADA DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*) DE CAPTURA INTENCIONAL"

Orientadora: Professora Rosane Silva

Coorientadora: Msc. Fernanda Sobral Short

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As bactérias resistentes aos antimicrobianos estão presentes em clínicas de saúde e no ambiente e tornaram-se uma preocupação global, uma vez que sua prevalência nas representam ameaças à saúde e ao bem-estar dos seres vivos e a economia. Devido a alta resistência antimicrobiana presente em seis bactérias patogênicas foi criado o grupo ESKAPE que significa as iniciais de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp. Os *Enterococcus* são organismos anaeróbicos facultativos e tolerantes a uma variedade de condições ambientais. As infecções causadas por *Enterococcus* incluem as urinárias, endocardites, bacteremia, diverticulite ou peritonites. Com o tempo, percebeu-se que bactérias pertencentes ao grupo *Enterococcus* spp, passaram a apresentar resistência aos antimicrobianos aos quais antes eram suscetíveis, tornando o tratamento mais preocupante. combaterem relação às bactérias resistentes presentes no ambiente, é necessário adotar uma abordagem multissetorial, com a associação de saúde pública, vigilância ambiental e de alimentos, conhecido como "One Health". Neste sentido, as tartarugas-verde, *Chelonia mydas* são excelentes bioindicadores/sentinelas para avaliar fatores antrópicos pois são espécies costeiras e altamente migratórias. O objetivo deste trabalho é analisar a presença de resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp isoladas de tartarugas-verde, *Chelonia mydas*, oriundas da Praia de Itaipu, Niterói, RJ, como biomarcadores. A coleta foi realizada pela doutoranda Fernanda Short em colaboração com o projeto Aruanã, onde foram capturadas 16 tartarugas-verdes e coletadas amostras através de swabs estéreis do pescoço e da cloaca de cada tartaruga seguido de sua identificação por meio de um espectrômetro de massa (MALDI-TOF), e armazenadas em glicerol a -20°C. Selecionamos 12 isolados previamente identificados como *Enterococcus* spp, foram crescidos em meio nutriente seguido em placas com ágar nutriente para a confirmação da identidade de *Enterococcus* spp por meio de um espectrômetro de massa (MALDI-TOF MS). Dez dos 12 isolados selecionados cresceram após o cultivo, nove foram confirmadas como *Enterococcus faecalis* e 1 da *Enterococcus hirae* depois o MALDI-TOF MS. Em seguida, prosseguimos para os testes de Susceptibilidade a antimicrobianos (ampicilina-10µg, ciprofloxacina - 5µg, rifampicina - 5µg, tetraciclina - 30µg e vancomicina - 30µg). Houve uma prevalência de resistência à tetraciclina observada em *E. faecalis*. Para a confirmação da resistência à tetraciclina, escolhemos os três genes alvo para Tetraciclina mais frequentes para a detecção. Os primers TetM (F e R) TetS (F e R) e TetL (F e R) foram utilizados para amplificação pelo método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). O produto de amplificação dos genes alvo da Tetraciclina, foram avaliados por a eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e visualizado por UV. Observamos que 8 isolados foram positivos para os genes TetM, 5 para o TetL, e todos os negativos para TetS. Finalmente, utilizando o sequenciamento Sanger, o consenso revelou e

confirmou a presença de 100% da região nucleotídica amplificada entre o TetM (F e R) para cada isolado.

Palavras-chave: Conceito “one health”; *Chelonia mydas*; *Enterococcus* spp; genes de resistência aos antimicrobianos; cultivo de bactérias

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Shanice Shamara Fitten

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLADA DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*) DE CAPTURA INTENCIONAL

Orientador: Prof. Rosane Silva
Coorientador: Fernanda Sobral Short

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Você sabia que animais como as tartarugas verdes encontrados ao longo da costa do Brasil podem ser usados como fonte de bactérias que não respondem mais aos antibióticos?

Enterococcus spp. é um grupo de bactérias comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais. Esses tipos de bactérias geralmente são inofensivos e contribuem para o equilíbrio do nosso intestino. Devido a sua extensiva exposição a antibióticos, *Enterococcus* spp não responde mais a alguns tipos comuns de antibióticos que já foram eficazes. Como consequência, muitas pessoas ficaram doentes em todo o mundo, o que agora se tornou uma crise. Para avaliar e compreender esses grupos de bactérias, foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde a utilização de um conceito que envolve as relações entre o nosso meio ambiente, o ser humano e os animais, uma vez que cada um influencia o outro de uma forma ou de outra. Da mesma forma, um animal que passa a maior parte do tempo migrando de uma região para outra e encontraria diversos tipos de poluentes foi selecionado para ser utilizado como fonte de amostras bacterianas. As amostras foram obtidas na praia de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, como parte de um projeto de 2019 conduzido por Fernanda Short em colaboração com o projeto Aruanã. Amostras foram coletadas do pescoço e da cloaca de 16 tartarugas verdes usando swab e depois levadas ao laboratório onde foram realizados testes para identificar cada bactéria. Das bactérias coletadas, 12 *Enterococcus* spp. foram selecionados, deixados crescer em meio de crescimento, seguido de confirmação de identidade usando uma técnica de espectrometria de massa chamada MALDI-TOF. Dez das 12 amostras cresceram com sucesso no meio de crescimento, enquanto as 2 restantes foram descartadas e o experimento continuou. Nove das bactérias Enterococci foram identificadas como *Enterococcus faecalis*, enquanto as restantes 1 *Enterococcus hirae*. A eficácia de 5 classes diferentes de antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina) foi então testada contra *Enterococcus*, dos quais a tetraciclina foi considerada ineficazes. A tetraciclina foi selecionada como o antibiótico de interesse devido ao aumento da prevalência da resistência a este antimicrobiano em *Enterococcus faecalis*, portanto, alguns genes responsáveis pela resistência à tetraciclina foram direcionados usando pares de primers (direto e reverso) para TetM, TetS e TetL. No final da pesquisa, 9 de 10 *Enterococcus faecalis* foram positivos para genes resistentes à tetraciclina TetM. Embora a quantidade de amostras não tenha sido suficiente para tornar a praia de Itaipu, em Niterói, um local de disseminação de *Enterococcus faecalis* resistente à tetraciclina, ainda é necessário educar sobre o uso e descarte adequado de antibióticos para evitar o agravamento deste problema.

ABSTRACT

Shanice Shamara Fitten

"ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLATED FROM GREEN TURTLES (*Chelonia mydas*) FROM INTENTIONAL CAPTURE".

Advisor: Professor Rosane Silva

Co-supervisor: MSc. Fernanda Sobral Short

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Antimicrobial-resistant bacteria are present in healthcare clinics and the environment and have become a global concern, as their prevalence poses threats to the health and well-being of living beings and the economy. Due to the high antimicrobial resistance present in six pathogenic bacteria, the ESKAPE group was created, which stands for the initials of *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. *Enterococcus* are facultative anaerobic organisms and are tolerant to a variety of environmental conditions. Infections caused by *Enterococcus* include urinary infections, endocarditis, bacteraemia, diverticulitis, or peritonitis. Over time, it was noticed that bacteria belonging to the *Enterococcus* spp group began to show resistance to antimicrobials to which they were previously susceptible, making the treatment more worrying. To combat resistant bacteria, present in the environment, it is necessary to adopt a multisectoral approach, with the association of public health, environmental and food surveillance, known as "One Health". In this sense, green turtles, *Chelonia mydas*, are excellent bioindicators/sentinels for evaluating anthropogenic factors as they are coastal and highly migratory species. The objective of this work is to analyse the presence of antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp isolated from green turtles, *Chelonia mydas*, from Praia de Itaipu, Niterói, RJ, as biomarkers. The collection was carried out by doctoral student Fernanda Short in collaboration with the Aruanã project, where 16 green turtles were captured, and samples were collected through sterile swabs from the neck and cloaca of each turtle, followed by storage in glycerol at -20°C. We selected 12 isolates previously identified as *Enterococcus* spp. They were grown in nutrient medium followed by nutrient agar plates to confirm the identity of *Enterococcus* spp using a mass spectrometer (MALDI-TOF MS). Ten of the 12 selected isolates grew after cultivation, nine were confirmed as *Enterococcus faecalis* and 1 as *Enterococcus hirae* after MALDI-TOF MS. We then proceeded to antimicrobial susceptibility tests (ampicillin-20µg, ciprofloxacin - 5µg, rifampicin- 5µg, tetracycline - 30µg and vancomycin - 30µg). There was a prevalence of tetracycline resistance in *E. faecalis*. To confirm tetracycline resistance, we chose the three most frequent tetracycline target genes for detection. The primers TetM (F and R), TetS (F and R) and TetL (F and R) were used for amplification by the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. The amplicons of Tetracycline target genes were evaluated by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized by UV. We observed that 8 isolates were positive for the TetM gene, 5 for TetL, and all negative for TetS. Finally, using Sanger sequencing, the consensus revealed that 100% of the DNA amplified nucleotide sequences between TetM (F and R) for each isolate were present, confirming the presence of Tetracycline TetM resistant genes *E. faecalis*.

Keywords: “one health” concept; *Chelonia mydas*; *Enterococcus* spp; antimicrobial resistance genes; bacteria cultivation

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	História de Antimicrobianos.....	1
1.1.1.	Classes de Antibióticos	2
1.1.2.	Mecanismo de ação de Antibióticos	3
1.1.3.	Desenvolvimento de Resistência a Antibióticos por Bactéria	4
1.1.4.	Mecanismos de Resistência usada pela Bactéria	4
1.1.5.	Efeitos Socioeconômicos da Resistência entre Humanos	6
1.1.6.	Resistência – Animais.....	6
1.2.	A História do <i>Enterococcus</i> spp. e ESKAPE.....	8
1.3.	One Health.....	8
1.4.	Espécies bioindicadoras.....	9
1.4.1.	Conceito	9
1.4.2.	Tartarugas-verde (<i>Chelonia mydas</i>).....	9
1.5.	Métodos de Detecção.....	10
1.5.1.	Testes de Susceptibilidade aos Antibióticos (Antibiogramas).....	11
1.5.2.	Amplificação de genes (PCR)	11
2.	JUSTIFICATIVA	12
3.	OBJETIVOS	13
3.1.	Objetivos geral	13
3.1.1.	Objetivos específicos	13
4.	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1.	Obtenção das amostras	14
4.2.	Cultivo de <i>Enterococcus</i> spp.	14
4.3.	Confirmação da identidade de <i>Enterococcus</i> spp. pelo MALDI-TOF.....	15
4.4.	Testes de Susceptibilidade ao Antibiótico (Antibiogramas).....	15
4.5.	Extração de DNA	15
4.6.	Quantificação do DNA.....	16
4.7.	Amplificação de DNA	16
4.8.	Sequenciamento Sanger.....	17
5.	RESULTADOS	18
5.1.	Cultivo de <i>Enterococcus</i> spp.	18
5.2.	Confirmação da identidade de <i>Enterococcus</i> spp. pelo MADLI-TOF.....	18
5.3.	Testes de Susceptibilidade ao Antibiótico (Antibiogramas).....	19
5.4.	Extração e Quantificação de DNA	20
5.5.	Amplificação de DNA	20
6.	DISCUSSÃO.....	24
7.	CONCLUSÃO	26
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. História de Antimicrobianos

Os antibióticos são medicamentos usados para combater infecções bacterianas em humanos e animais. Eles podem ser medicamentos naturais ou sintéticos e são capazes de combater as bactérias, matando-as ou dificultando seu crescimento e multiplicação, sem afetar adversamente o hospedeiro, por meio de toxicidade seletiva (Madigan *et al*, 2016).

Muitos anos antes que houvesse um bom conhecimento sobre doenças causadas por bactérias, a descoberta dos antibióticos e métodos preventivos, o mundo naquela época registrava altas taxas de mortalidade (Mohr, 2016). Consequentemente, as altas taxas de morbidade e mortalidade colocaram imensa pressão sobre os cientistas para conter a rápida incidência de cólera, sífilis, peste, tuberculose e febre tifoide, todas consideradas epidemias durante o século XX (Mohr, 2016). Como resultado dessas condições hostis, os cientistas foram encarregados de encontrar métodos viáveis para lidar adequadamente com essas epidemias em espiral. Felizmente, embora sem querer, a penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, professor de bacteriologia no St. Mary 's Hospital, em Londres do fungo produtor de penicilina (Kourkouta L *et al*, 2018). Após sua descoberta, foi introduzido como agente terapêutico em 1940 contra doenças bacterianas como difteria e pneumonia. Como resultado, vários antibióticos foram descobertos como meio de tratar diferentes tipos de doenças bacterianas que têm diferentes mecanismos de ação (Guimarães *et al*, 2010).

Embora a descoberta da penicilina e de vários outros antibióticos tenha funcionado com sucesso no controle de doenças, agindo como um agente bactericida ou bacteriostático, eles não eram completamente seletivos e também antagonizavam as bactérias residentes que eram essenciais para a microbiota de uma pessoa (Etebu e Arikekpar, 2016). Quando a microbiota residente é interrompida, ela remove a competição por recursos, altera nichos e vantagens de crescimento, o que pode levar a um supercrescimento no número de patógenos oportunistas que resultam em doenças (Wu Y *et al*, 2021). Assim, o diagnóstico adequado e a prescrição de antibióticos são essenciais para prevenir problemas globais mais sérios, como resistência, em relação a patógenos oportunistas e como eles respondem a esses medicamentos (Etebu e Arikekpar, 2016). No entanto, foram desenvolvidas diferentes classes de antibióticos que funcionavam segundo diferentes mecanismos de ação para combater as atividades bacterianas. Infelizmente, muitas dessas classes de medicamentos tornaram-se

ineficazes contra bactérias, o que agora pressiona os cientistas a desenvolverem novos antimicrobianos para combater a resistência bacteriana (Aslam *et al*, 2018).

1.1.1. Classes de Antibióticos

Em relação à descoberta de diferentes antibióticos surgiu a necessidade de classificação. Os antibióticos são classificados principalmente com base em sua composição química (estrutura molecular), mecanismo de ação e espectro de atividade, seguidos por sistemas de classificação secundária como modos de administração: oral, tópico ou via intramuscular (Etebu e Ariekpar, 2016).

No que diz respeito à estrutura molecular dos antibióticos, todos os medicamentos semelhantes em estrutura molecular tendem a ser geralmente idênticos em sua eficácia, efeitos colaterais e toxicidade. Os antibióticos podem ser de amplo espectro ou ser direcionado para uma classe ou espécie bacteriana (Fair e Tor, 2014). Os antimicrobianos de atividade de espectro restrito são específicos apenas para certas cepas ou grupos de bactérias (estes são frequentemente preferidos, pois não afetam bactérias não patogênicas residentes), enquanto os de atividade de amplo espectro são inespecíficos e são capazes de atuar em uma faixa mais ampla de bactérias (muitas vezes usado quando a bactéria responsável pela doença não pode ser identificada, mas infelizmente perturba a microbiota) (Fair e Tor, 2016).

O mecanismo de ação indica se os antibióticos funcionam para matar bactérias (bactericidas) ou inibem o crescimento/reprodução de bactérias (bacteriostáticos). Essas classes são beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, ansamicinas, quinolonas, estreptograminas, lipopeptídeos, sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos e oxazolidinonas (Madigan *et al*, 2016). Beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, ansamicinas, quinolonas, estreptograminas e lipopeptídeos são todos agentes bactericidas, enquanto sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos e oxazolidinonas atuam como bacteriostáticos (Bruning, 2014) (**Figura 1**).

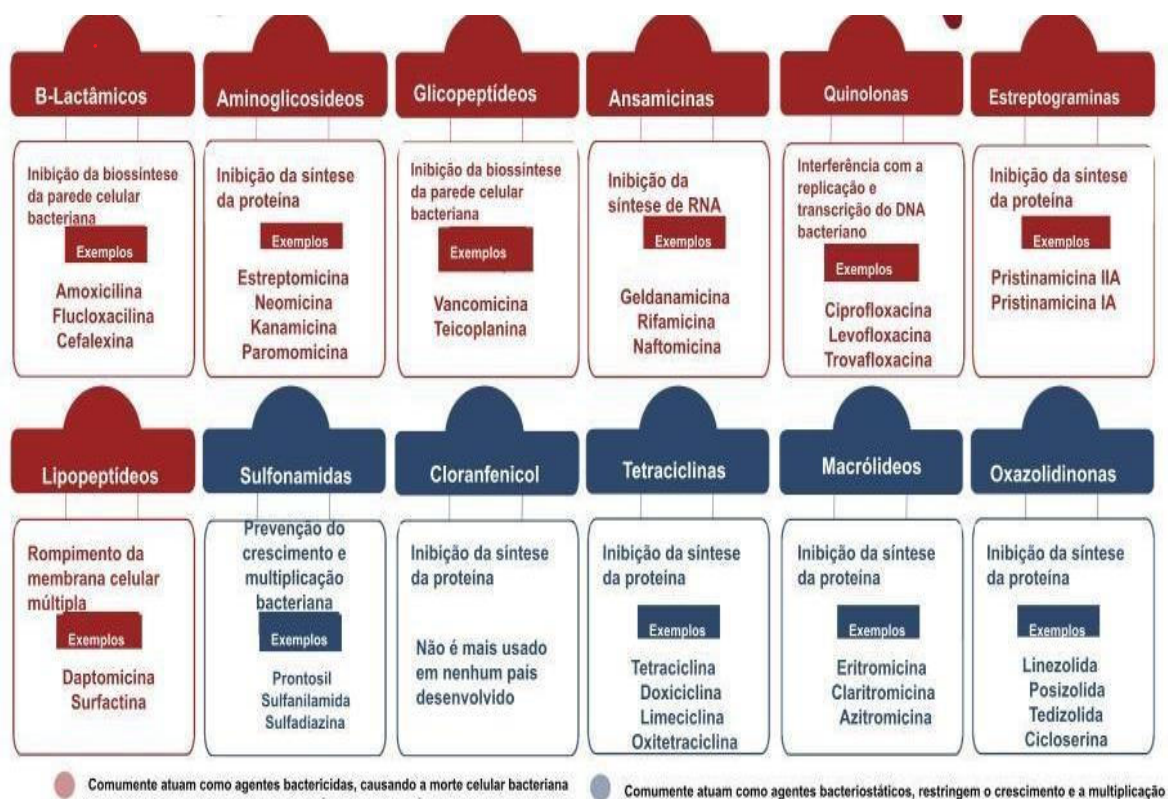


Figura 1: Diferentes classes de antibióticos, exemplos e os mecanismos de ações. Fonte: [ReAct](#)

1.1.2. Mecanismo de ação de Antibióticos

Grupos de antibióticos são agrupados com base em seu mecanismo de ação, conforme mencionado anteriormente na **seção 1.1.1**. Esses vários mecanismos de ação são os caminhos pelos quais cada classe de antibióticos trabalha para matar ou inibir o crescimento e a multiplicação de bactérias (Madigan *et al*, 2016). Esses mecanismos incluem **i)** inibição da biossíntese da parede celular bacteriana (Beta-lactâmicos e glicopeptídeos), **ii)** inibição da síntese de proteínas (aminoglicosídeos, estreptograminas, cloranfenicol, tetraciclínas, macrolídeos e oxazolidinonas), **iii)** rompimento da membrana celular múltipla (lipopeptídeos), **iv)** prevenção do crescimento e multiplicação bacteriana (sulfonamidas) **v)** inibição da síntese de RNA (ansamicinas) e **vi)** interferência com a replicação e transcrição do DNA bacteriano (quinolonas) (Bunning, 2014) (**Figura 1**).

1.1.3.Desenvolvimento de Resistência a Antibióticos por Bactéria

A resistência aos antibióticos é um fenômeno natural, que existe em bactérias como um dos muitos mecanismos utilizados como defesa contra outras bactérias, químicas, e outras substâncias naturais ou sintéticas presentes na ambiente delas, que possam ser uma ameaça para a sua sobrevivência. Logo após a introdução dessas drogas no mercado global, com exceção da Penicilina que supostamente apresenta resistência intrínseca antes de seu lançamento no mercado, algumas bactérias foram capazes de desenvolver mecanismos de resistência contra essas drogas, a fim de escapar e sobreviver aos seus efeitos prejudiciais. A tetraciclina foi introduzida no mercado em 1950, mas mais tarde descobriu-se que as bactérias-alvo desenvolveram resistência a essa droga. Esta tendência continuou em 1962, quando a resistência à metilicina foi identificada, seguida pela eritromicina em 1968, gentamicina em 1979, ceftazidima em 1987 e vancomicina em 1988 (**Figura 2**).

Quando se fala em bactérias resistentes, é importante investigar se essas espécies são naturalmente resistentes (ou seja, sempre apresentaram resistência intrínseca a determinado antibiótico, por exemplo *Escherichia coli* a macrolídeos), ou se adquiriram essa resistência por mutação ou seleção (por exemplo, resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina) (Habboush e Guzman, 2023).

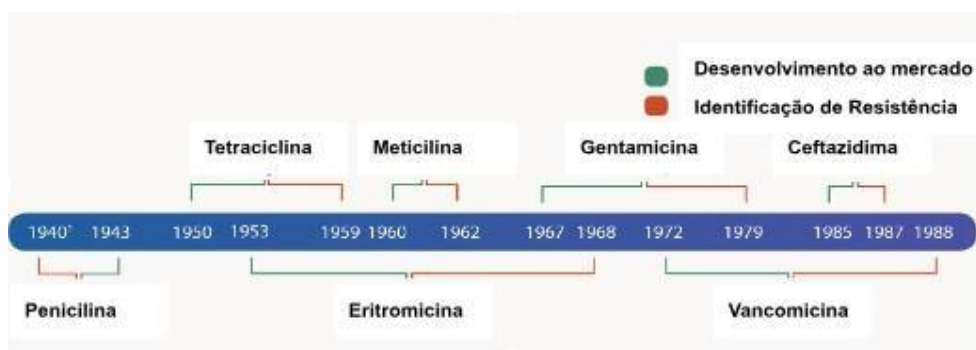


Figura 2: Desenvolvimento de resistência com linha do tempo com os eventos principais. Esta tabela foi adaptada de “Ameaças de resistência a antibióticos nos Estados Unidos, 2013” do CDC por FFAST.

1.1.4.Mecanismos de Resistência usada pela Bactéria

Para escapar aos efeitos nocivos dos antibióticos e aumentar as suas hipóteses de sobrevivência, as bactérias, sendo notáveis na plasticidade genética, foram capazes de

desenvolver vários mecanismos. Dois desses principais mecanismos genéticos do ponto de vista evolutivo incluem: **i)** mutação genética e **ii)** aquisição de determinantes de resistência via codificação de DNA de outras bactérias através da transferência horizontal de genes mencionada anteriormente na **seção 1.1.2** (Munita e Arias, 2016).

A mutação genética sendo um dos mecanismos mais importantes para as bactérias, confere resistência aos antibióticos através de modificações no alvo do antibiótico que diminui a afinidade pelo medicamento, inativação enzimática de antibióticos e expressão de bombas de efluxo multidrogas para expulsão de moléculas antibióticas prejudiciais (**Figura 3**) (Blair *et al.*, 2015). Por exemplo, a resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à Rifampicina, um antibiótico de primeira linha utilizado no tratamento da tuberculose, pode ser atribuída a mutações no gene bacteriano *rpoB* (El Mehdi Bentaleb *et al.*, 2017).

Além da mutação, a transferência horizontal de genes (THG) de genes resistentes por meio da codificação do DNA de uma bactéria para outra também causa a aquisição de genes resistentes. Através do TGH, as bactérias são capazes de adquirir genes externos via: **i)** transformação (incorporação de DNA), **ii)** transdução (mediada por fagos) e **iii)** conjugação (Munita e Arias, 2016). Portanto, o TGH também foi responsável pela disseminação de genes de resistência antimicrobiana no meio ambiente e pelo desenvolvimento de resistência antimicrobiana entre bactérias de relevância clínica.

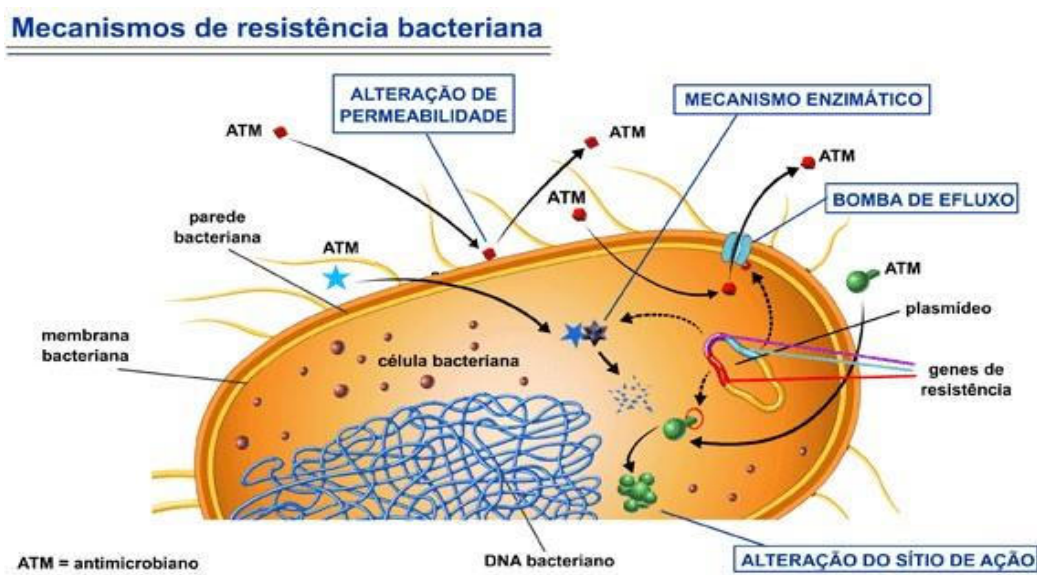


Figura 3: Mecanismos de resistência. Fonte: centerLab

1.1.5.Efeitos Socioeconômicos da Resistência entre Humanos

Como resultado de bactérias resistentes a antimicrobianos, muitas doenças em humanos que inicialmente responderam a certas classes de antimicrobianos, agora se tornaram ineficazes. Devido à ineficácia desses medicamentos contra doenças encontradas em seres humanos, houve uma pressão sobre o sistema de saúde pública global e a economia global (Gelband *et al*, 2015). Consequentemente, gera um aumento dos custos dos cuidados de saúde, da perda de produtividade, do impacto negativo no comércio global e da dificuldade em controlar surtos (Kobeissi *et al*, 2021) . Há também as consequências de ter que desenvolver antibióticos de segunda geração dispendiosos para combater estas doenças resistentes, aumentar o tempo de hospitalização e aumentar a morbidade e mortalidade de mortes relacionadas com doenças resistentes (Shrestha *et al*, 2022).

Com base nos efeitos socioeconômicos acima mencionados sobre a população, o Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relataram que bactérias resistentes a antimicrobianos foram responsáveis por cerca de 2.8 milhões de infecções, o que consequentemente causou a morte de 35.000 pessoas a cada ano nos Estados Unidos da América (EUA) (CDC 2019). Com a ameaça constante da disseminação de genes resistentes aos antibióticos (GRA) presentes no nosso ambiente, e os seus efeitos prejudiciais sobre a estabilidade econômica global, prevê-se que até 2050 será necessário um custo adicional de 1 bilhão de dólares em cuidados de saúde, juntamente com perdas de 1 bilhão a 3,4 bilhões de dólares do Produto Interno Bruto (PIB) por ano até 2030 (CDC, 2023).

1.1.6.Resistência – Animais

Como há preocupações crescentes com a resistência antimicrobiana em humanos, também há tendências e preocupações crescentes em animais. Os antibióticos têm sido amplamente utilizados em todo o mundo na criação de animais para consumo (Marshall e Levy, 2011). Essas drogas são usadas tanto para promover o crescimento do gado quanto para prevenir as doenças (Caneschi *et al*, 2023). No entanto, com o uso contínuo, pode haver a

seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos que afetam a saúde humana e consequentemente pode ser um problema de saúde pública. A transferência de bactérias resistentes a antimicrobianos de animais para humanos pode se dar por meio do consumo de produtos alimentícios, contato ambiental ou contato agrícola (Caneschi *et al*,2023).

Um estudo realizado revelou que, em 2017, a China consumiu 45% do uso mundial de antimicrobianos usados em animais. O referido estudo também projetava que, até o ano de 2030, a China continuaria como o maior consumidor, com uma taxa de 43%. Também foi revelado que China (45%), Brasil (7,9%), Estados Unidos (7,0%), Tailândia (4,2%), Índia (2,2%), Irã (1,9%), Espanha (1,9%), Rússia (1,8%), México (1,7%) e Argentina (1,5%), foram registrados no ano de 2017, como os 10 principais países que mais consumiram antimicrobianos veterinários. Esses países respondem conjuntamente por um total de 75% do uso global de antimicrobianos veterinários na produção de produtos de origem animal e 50% da população (Tiseo *et al*, 2020) (**Figura 4**).

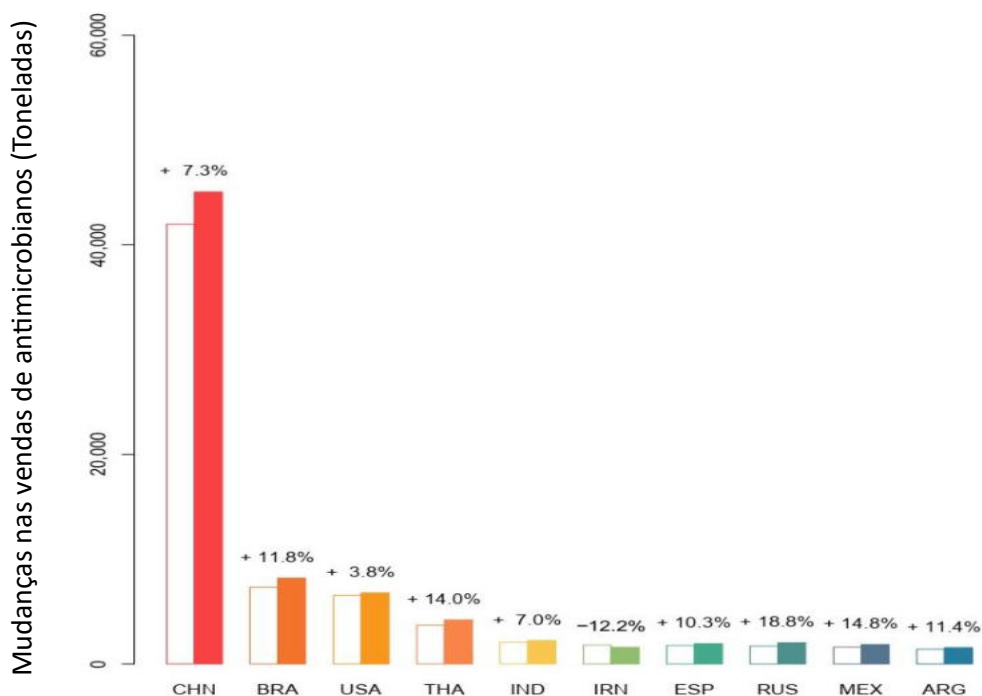


Figura 4: O consumo de antimicrobianos veterinários nos 10 principais países em 2017 (barras brancas) e seu consumo projetado 2030 (barras coloridas). CHN, China; BR, Brasil; USA, Estados Unidos; THA, Tailândia; IND, Índia; IRN, Irã; ESP, Espanha; RUS, Rússia; MEX, México; ARG, Argentina. Adaptado de: Tiseo *et al*, 2020.

1.2. A História do *Enterococcus* spp. e ESKAPE

Devido à alta resistência antimicrobiana presente em seis bactérias patogênicas foi criado o grupo ESKAPE que corresponde as iniciais de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp. (Denissen *et al*, 2022)

Os *Enterococcus* são organismos gram-positivos, anaeróbios facultativos e tolerantes a uma variedade de condições ambientais. *Enterococcus* são habitantes naturais do trato gastrointestinal em animais e humanos, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* duas das espécies de patogênese mais oportunistas (Barnes *et al*, 2016). As infecções causadas por *Enterococcus* incluem as urinárias, endocardites, bacteremia, diverticulite ou peritonites. Com o tempo, percebeu-se que bactérias pertencentes ao grupo *Enterococcus* spp., passaram a apresentar resistência aos antimicrobianos aos quais antes eram suscetíveis, tornando o tratamento mais preocupante. Por exemplo, *Enterococcus* resistentes à vancomicina foram detectados em isolados de hemocultura analisados de pacientes com manifestações clínicas de infecção do trato urinário (ITU) associada a um cateter, bacteremia associada a um cateter vascular, infecção intra-abdominal e pélvica e endocardite (Oliveira *et al*, 2020).

1.3. One Health

Como uma abordagem para combater rapidamente bactérias multirresistentes e a ameaça que representam para a saúde pública e o bem-estar, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma ação multissetorial, que inclui o setor de produção agrícola e animal, o setor de processamento de alimentos, o setor de saúde humana e o setor ambiental (WHO, 2022).

Cada setor do nosso ecossistema está interconectado e, portanto, cada setor influencia a atividade e a abundância do outro. Com isso, genes multirresistentes são transferidos constantemente de humanos para animais e vice-versa, o que acaba poluindo nosso meio ambiente e conseqüentemente afetando outros setores de nosso ecossistema (CDC, 2022) (Figura 5).

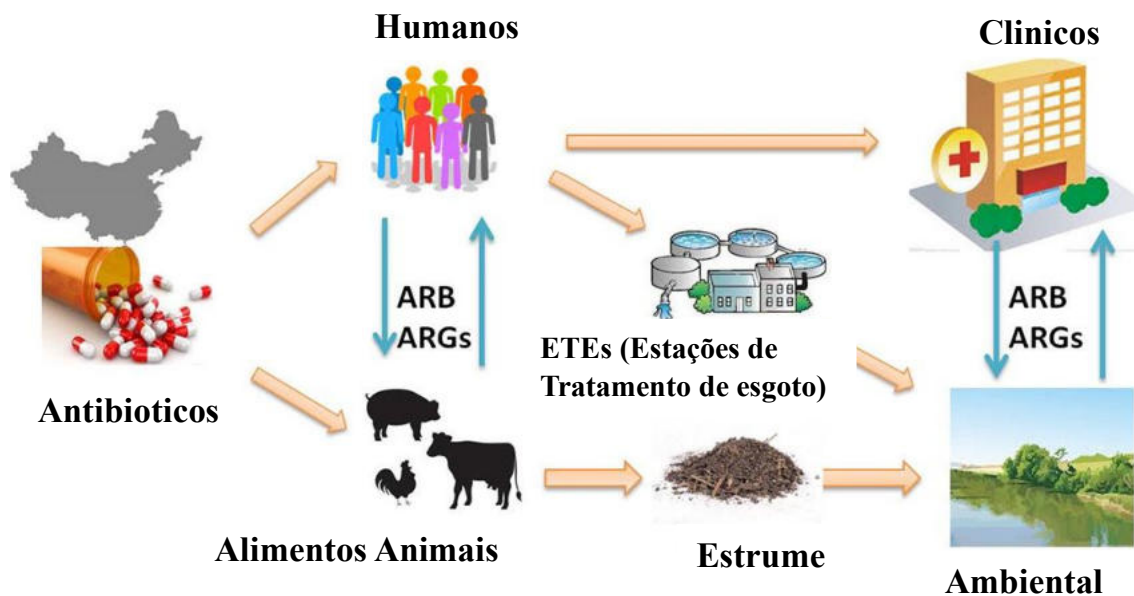


Figura 5: Adaptado de *One health concept*. Fonte: Qiao M., GuoYing G., Singer AC, GuanZhu Y. 2018. Bactérias resistentes a antimicrobiana – ARB, Genes resistentes a antimicrobiana.

1.4. Espécies bioindicadoras

1.4.1. Conceito

Como resultado da transferência de genes de resistência antimicrobiana de uma espécie interconectada para outra, surge a oportunidade de investigar usando uma ou mais espécies de qualquer setor ecológico, neste sentido, o conceito “One Health”, a fim de melhor estudar e avaliar a multirresistência antimicrobiana (WHO, 2015).

Essas espécies são chamadas de espécies bioindicadoras e são organismos cuja presença e abundância podem ser usadas para monitorar a saúde do meio ambiente. Essas espécies são excelentes para avaliar fatores antrópicos e até que ponto o ambiente foi comprometido por sua presença, por exemplo, *Chelonia mydas* (Arias, 2007).

1.4.2. Tartarugas-verde (*Chelonia mydas*)

As tartarugas marinhas são popularmente conhecidas por seu comportamento migratório, pois o fazem para alimentação, repouso e reprodução, e são conhecidas por migrar de maneira transoceânica em zonas tropicais subtropicais (Lohmann *et al*, 1996).

Tartarugas-Verde (*Chelonia mydas*) é comumente conhecida por migrar muitos quilômetros de seu local de alimentação para sua praia natal para se reproduzir. (Candan. O e Candan. D.E, 2020).

Devido à sua constante migração transoceânica e passando a maior parte das suas vidas ao longo das costas marinhas, as tartarugas-verde estão expostas a muitos fatores antropogênicos. Como resultado, *Chelonia mydas* (**Figura 6**) serve como um excelente bioindicador para o monitoramento de poluição e, conseqüentemente, a saúde pública humana. Além disso, devido à constante exposição à poluição costeira, *Chelonia mydas* serve como um excelente reservatório para o estudo de bactérias resistentes (Read *et al*, 2014).



Figura 6: Tartaruga-verde, *Chelonia mydas*. Fonte: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/>

1.5. Métodos de Detecção

Com o estabelecimento de uma espécie bioindicadora viável, como a *Chelonia mydas*, é importante usar métodos eficientes para estudar e avaliar cuidadosamente a extensão em que os genes de resistência antimicrobiana se espalharam no ambiente. Com isso, é essencial a aplicação tanto de métodos tradicionais para detectar a suscetibilidade de amostras

bacterianas coletadas de *Chelonia mydas*, quanto de métodos moleculares para confirmar a presença de genes de resistência.

1.5.1. Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos (Antibiogramas)

O antibiograma é uma forma de método tradicional de testar a suscetibilidade de amostras bacterianas usando diferentes classes de antibióticos. A forma comum de teste de antibiograma usada é a difusão em disco, onde o meio de ágar é adicionado a uma placa de Petri e é inoculado com a amostra, após os discos de antibiótico são colocados estrategicamente no topo (Madigan *et al*, 2016).

Algumas das vantagens da utilização deste método são **i)** Baixo custo; **ii)** Simples e fácil de executar **iii)** Simples e rápido de interpretar **v)** Alta flexibilidade na seleção de antibióticos (Madigan *et al*, 2016).

1.5.2. Amplificação de genes (PCR)

A *Polymerase Chain Reaction* - PCR é uma técnica molecular utilizada para fazer inúmeras cópias de um segmento de DNA de interesse. A PCR faz isso usando um DNA modelo com a região de interesse (neste caso, genes de resistência a antibióticos como *tetA*), juntamente com *primers* específicos para as extremidades desse gene alvo que se ligarão ou se ligarão a seus locais complementares onde a amplificação ocorrerá e permitirá a confirmação de genes-alvo (Britannica, 2023).

Algumas das vantagens da utilização deste método são **i)** Técnica muito precisa; **ii)** Baixo custo; **iii)** Permite a detecção de até mesmo uma única cópia de um modelo de DNA específico; **iv)** Amplifica com eficiência e rapidez uma pequena quantidade de amostra de DNA para milhões de cópias em apenas algumas horas (Madigan *et al*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Com o crescente problema global de bactérias resistentes, tem sido colocada grande urgência no monitoramento deste problema por investigadores e cientistas. Muitas doenças causadas por bactérias resistentes já não respondem a numerosos antimicrobianos, aos quais eram anteriormente suscetíveis. Como resultado, muitos indivíduos sucumbiram a estas infecções, colocando pressão sobre o custo do tratamento na economia global e na saúde pública. Para combater a rápida propagação de genes resistentes, é extremamente importante aplicar a abordagem multissetorial do Conceito de Saúde Única, uma vez que permite o direcionamento adequado da saúde humana, animal e ambiental. *Enterococcus* spp, geralmente parte da microbiota intestinal humana e animal, tornou-se uma preocupação crescente devido à sua prevalência no meio ambiente e às amostras coletadas de animais e humanos durante o tratamento médico. Além de sua presença aumentada em materiais clínicos e ambientais, genes altamente resistentes foram detectados contra antibióticos de primeiras gerações usados para tratar doenças relacionadas a *Enterococcus*, por exemplo, genes responsáveis pela resistência à tetraciclina TetM, TetS, TetL, TetK e TetO. Com base nisso, acredita-se, que o estudo de reservatórios ambientais contendo *Enterococcus* spp resistentes pode ser ideal para os objetivos desta pesquisa. Portanto, para estudar e identificar efetivamente a atividade da comunidade microbiana e o perfil funcional dos genes, incluindo genes de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp, é importante utilizar técnicas dependentes e independentes de cultura. Trabalho prévio do laboratório identificou bactérias presentes na cloaca e pescoço de 16 tartarugas (*Chelonia mydas*) e verificou a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos (Short, F.S *et al*, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos geral

Analisar *Enterococcus* spp. resistentes previamente isolados de tartarugas-verde, *Chelonia mydas*, oriundas da Praia de Itaipu, Niterói, RJ.

3.1.1. Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade e o crescimento de *Enterococcus* spp. em meio Müller Hinton usando diferentes classes de antimicrobianos .
- Avaliar os genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

A coleta foi realizada pela doutoranda Fernanda Short em colaboração com o projeto Aruanã, onde foram capturadas 16 tartarugas-verde, que foram numerados individualmente de 1 a 16, pesados e coletadas amostras através de *swabs* estéreis do pescoço (N) e da cloaca (C) de cada tartaruga, seguido de sua identificação por meio de um espectrômetro de massa *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), e armazenadas em glicerol a -20°C.

4.2. Cultivo de *Enterococcus* spp.

12 isolados bacterianos de *Enterococcus* spp. foram selecionados e cultivados em meio nutriente sem antibióticos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Isolados prévios de *Enterococcus* avaliados neste trabalho e seu local de isolamento. N- Pescoço, C - Cloaca. Col - Colônia. Cada número na frente representa o número de identificação de cada tartaruga, de onde veio cada amostra. Por exemplo, 8N Col. 1 é uma colônia numerada 1 que veio do pescoço da tartaruga 8.

Isolados
5N Col. 4
5N Col. 5
8C Col. 4
8C Col. 5
8N Col. 1
8N Col. 2
8N Col. 3
8N Col. 4
8N Col. 5
9N Col. 1
10C Col. 1
10C Col. 4

4.3. Confirmação da identidade de *Enterococcus* spp. pelo MALDI-TOF

Dos 12 isolados de *Enterococcus* spp. apenas 10 cresceram com sucesso em meio nutriente e ágar nutriente sem antibiótico (5N COL.5, 8N COL.1, 8N COL.2, 8N COL.3, 8N COL.4, 8N COL.5, 8C COL.5, 9N COL.1, 10C COL.1 e 10C COL.4). Os 2 isolados que não cresceram foram descartados e o experimento continuou com a confirmação da identidade por *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) dos 10 isolados.

4.4. Testes de Susceptibilidade ao Antibiótico (Antibiogramas)

Em seguida, prosseguimos para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos usando disco de antibióticos (ampicilina-10µg, ciprofloxacina - 5µg, rifampicina - 5µg, tetraciclina - 30µg e vancomicina - 30µg) usando meio Müller Hinton. As placas foram deixadas para incubar 37°C por 24h. Depois das 24 h, foram retiradas as placas da estufa e avaliadas para cada amostra medindo-se a zona do halo em milímetros, comparando-a com o Manual de Antibiograma 2023- CLSI do *Clinical and Laboratory Standards Institute* a fim de determinar a resistência ou sensibilidade de cada um.

4.5. Extração de DNA

Os isolados resistentes previamente cultivados na **secção 4.4** foram centrifugados por 10 minutos a 3200 rpm, seguido da adição de tampão (Tris - HCL 25mM pH 7,5; EDTA 1mM, NaCl 0,1 mM, SDS 0,3%) e agitados suavemente. para suspender as células.

Às células centrifugadas, foi adicionada proteinase K (estoque: 20mg/ml), misturada e incubada durante a noite a 37°C. Os tubos foram retirados da incubadora após 24 horas e deixados atingir a temperatura ambiente. Ao atingir a temperatura ambiente, adicionou-se NaCl saturado (-6M) e agitou-se vigorosamente durante 30 segundos até a mistura ficar opaca. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos em velocidade máxima (10.000 rpm) utilizando centrífuga clínica. Foram feitas observações de pellets brancos e de um sobrenadante transparente e viscoso correspondente às proteínas precipitadas e ao DNA,

respectivamente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, seguido da adição de etanol 100% e centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm.

Os pellets foram lavados com etanol 70%, centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm, seguido da remoção do etanol 70%. Os pellets foram ressuspensos em TE-4 e depois aquecidos a 55°C por 10 minutos para solubilizar o DNA, transferidos para tubo Eppendoff de 1ml e armazenados no freezer a -20°C.

4.6. Quantificação do DNA

O DNA extraído de cada amostra foi posteriormente quantificado utilizando um *NanoPhotometer®N120/NP80/N60/N50/C40*, e foram obtidas a concentração (ng/μl) e a absorbância (A260/A280) de cada um.

4.7. Amplificação de DNA

Houve uma prevalência de resistência à tetraciclina nas amostras, e para a confirmação da resistência à tetraciclina, escolhemos os três genes alvo para Tetraciclina mais frequentes para a detecção (Jia *et al*, 2014 e Rathnayake *et al*, 2012). Os primers TetM (F:GTGTGACGAACCTTACCGAA e R:GCTTTGTATCTCCAAGAACA), TetS (F:CCATTGATATCGAAGTACCTCCAA e R:ATCGCTGGACCGACTCCTT), e TetL (F:CCATTGATATCGAAGTACCTCCAA e R:ATCGCTGGACCGACTCCTT) descrito na **tabela 2** foram utilizados para amplificação pelo método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando o termociclador *Applied Biosystems Verti 96 Well* com os seguintes parâmetros de temperaturas de anelamento de 50°C para TetM e 55°C para TetL e TetS para 35 ciclos.

Tabela 2: Primers de PCR resistentes à tetraciclina.

Genes	Sequência dos Primers (5'-3')	Tamanho (b p)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referências
TetM	F: GTGTGACGAACTTTACCGAA R: GCTTTGTATCTCCAAGAACAC	501	50	[Jia <i>et al</i> , 2014]
TetL	F: CCATTGATATCGAAGTACCTCCAA R: AGGAAGTGGTGTTACAGATAAACCAA	68	55	[Rathnayake <i>et al</i> , 2012]
TetS	F: GGGTAAAGCATTTGGTCTTATTGG R: ATCGCTGGACCGACTCCTT	63	55	[Rathnayake <i>et al</i> , 2012]

*Todos os primers foram selecionados a partir de informações publicadas.

O produto de amplificação dos genes alvo da Tetraciclina, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (TetM) e 2% (TetS e TetL), corado com brometo de etídeo e visualizado por UV.

4.8. Sequenciamento Sanger

Usando o kit de sequenciamento *BigDye™ Terminator v3.1*, o DNA amplificado foi sequenciado usando o *3500 Genetic Analyzer*.

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo de *Enterococcus* spp.

Dos 12 isolados de *Enterococcus* spp selecionados cultivados em ágar nutriente sem antibióticos (**Tabela 1**), apenas 10 (5N COL.5, 8N COL.1, 8N COL.2, 8N COL.3, 8N COL.4, 8N COL.5, 8C COL. 5, 9N COL.1, 10C COL.1 e 10C COL.4) cresceram após 24 horas a 37°C na incubadora. Estes 2 isolados (5N COL.4 e 8C COL.4) foram deixados crescendo durante mais 24 horas à temperatura ambiente, no entanto, após esse período de tempo, não houve crescimento visível. Essas amostras foram descartadas e o experimento continuou com as 10 restantes.

5.2. Confirmação da identidade de *Enterococcus* spp. pelo MADLI-TOF

Depois de realizar o *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)(**Tabela 3**), 9 de 10 amostras (5N COL.5, 8N COL.1, 8N COL.2, 8N COL.3, 8N COL.4, 8N COL.5, 8C COL.5, 9N COL.1 e 10C COL.1) foram confirmados como *Enterococcus faecalis* enquanto a amostra restante (10C COL.4) foi confirmada como *Enterococcus hirae*. Com base nos valores de pontuação de cada amostra estarem entre 2,00 e 3,00, todas foram interpretadas como identificadas com grande confiança (+++).

Tabela 3: Identificação das espécies e classificação do valor log (pontuação) das amostras. Pescoço (N), Cloaca (C), COL-colônia.

Amostras	Valor de log (pontuação)	Espécies
5N COL. 5	2.24	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N COL. 1	2.27	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N COL. 2	2.28	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N COL. 3	2.22	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N COL. 4	2.39	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N COL. 5	2.24	<i>Enterococcus faecalis</i>
8C COL. 5	2.31	<i>Enterococcus faecalis</i>
9N COL. 1	2.38	<i>Enterococcus faecalis</i>
10C COL. 1	2.24	<i>Enterococcus faecalis</i>
10C COL. 4	2.30	<i>Enterococcus hirae</i>

5.3. Testes de Susceptibilidade ao Antibiótico (Antibiogramas)

Todas as amostras foram resistentes à tetraciclina (**Tabela 4**). A determinação da sensibilidade e resistência foram baseadas nas recomendações do manual antibiograma 2023-CLSI do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. O manual forneceu os parâmetros necessários para medir o diâmetro do halo se formado, ao redor de cada disco de antibiótico, para distinguir sensibilidade ou resistência em termos de *Enterococcus* spp e também, as classes/concentrações de antibióticos a ser utilizados.

Tabela 4: Teste de sensibilidade aos antibióticos de cada amostra utilizando discos de papel de filtro impregnados com antibióticos. Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Rifampicina (RIF), Tetraciclina (TET), Vancomicina (VAN), Sensível-S, Resistente-R, N-pescoço, C-cloaca, Col-colônia.

Amostras	AMP	CIP	RIF	TET	VAN	Espécies
5N Col. 5	S	R	R	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N Col. 1	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N Col. 2	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N Col. 3	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N Col. 4	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8N Col. 5	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
9N Col. 1	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
8C Col. 5	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
10C Col. 1	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus faecalis</i>
10C Col. 4	S	S	S	R	S	<i>Enterococcus hirae</i>

5.4. Extração e Quantificação de DNA

Tabela 5: Concentrações em nanogramas por mililitros (ng/μl) e absorvâncias (A260/A280) do DNA extraído e quantificado. Pescoço- N, Cloaca- C, COL- Colônia

Quantificação do DNA		
Amostras	Concentrações (ng/μl)	Absorvância (A260/A280)
5N COL. 5	1.8500	1.947
8N COL. 1	42.700	1.596
8N COL. 2	11.850	1.717
8N COL. 3	21.450	2.043
8N COL. 4	8.6500	1.713
8N COL. 5	11.300	1.674
8C COL. 5	8.9000	1.589
9N COL. 1	18.300	1.916
10C COL. 1	5.3000	2.163
10C COL. 4	3.9000	1.814

5.5. Amplificação de DNA

Após quantificação, amplificação foi realizada utilizando 9 das 10 amostras, excluindo a amostra 5N COL.5, que foi descartada devido à sua concentração extremamente baixa conforme mencionado na **Seção 5.4 (Tabela 5)**. Além das 8 amostras de *E. faecalis* (8N COL.1, 8N COL.2, 8N COL.3, 8N COL.4, 8N COL.5, 8C COL.5, 9N COL.1, 10C COL.1), 1 *E. hirae* (10C COL.4), controles positivos (*Enterococcus faecalis* AV11-7 e *Enterococcus faecalis* AC-4) para TetM, TetS e TetL foram obtidos do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ e amplificados. Todas as *E. faecalis* amostras foram positivas para TetM como visto na **Figura 7**, e o tamanho do amplicon mencionado na **Tabela 2** correspondeu às bandas que apareceram sob luz UV. O mesmo foi repetido para TetS e TetL, exceto que eles foram amplificados ao mesmo tempo, e que foram autorizados a correr em ágar a 2% usando uma escada de DNA de 50 pb devido ao seu tamanho, conforme descrito na **Tabela 2**. Todas as amostras foram negativas para o gene TetS ao observar

o gel sob luz UV como vista na **Figure 8**, enquanto apenas 8N COL.4, 8N COL.5, 8C COL.5, 9N COL.1, 10C COL.1 e 10C COL.4 foram positivos para TetL como mostrada na **Figura 9**. Em relação ao consenso obtido no sequenciamento Sanger após alinhamento, todas as sequências de nucleotídeos do isolado *E.faecalis* sequenciado com primer TetM reverso (GCTTTGTATCTCCAAGAACA) corresponderam entre 20 pb e 230 pb com variação mínima entre 1 pb e 19 pb. Por outro lado, todo o DNA de *E. faecalis* sequenciado usando o iniciador forward TetM (GTGTGACGAACCTTACCGAA) correspondeu à região de nucleotídeos entre 250 bp e 491 bp com pequenas variações no final das sequências de nucleotídeos, como visto na **Figura 10**. Além do alinhamento de nucleotídeos individuais de cada amostra, cada consenso se alinhou perfeitamente a uma região TetM de *Enterococcus faecalis* de origem retirada do Geneious prime (**Figura 11**). Uma contagem geral revelou que as colônias 1, 2 e 3 do pescoço da tartaruga 8 foram todas positivas apenas para TetM, enquanto as colônias 4 e 5 do pescoço da tartaruga 8, a colônia 5 da cloaca da tartaruga 8 e a colônia 1 da cloaca da tartaruga 10 foram todos positivos para TetM e TetL. Finalmente, a colônia 4 da cloaca da tartaruga 10 foi positiva apenas para TetL (**Tabela 5**).

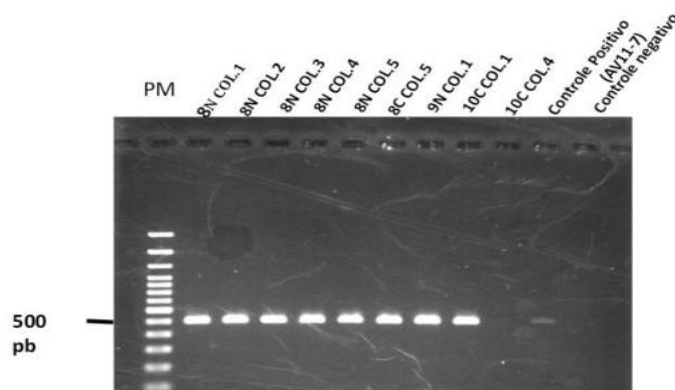


Figura 7: Amplicons PCR TetM de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus hirae*. Coluna 1, escada de DNA de 100 pb; coluna 2 8N COL.1; coluna 3, 8N COL.2; coluna 4, 8N COL.3; coluna 5, 8N COL.4; coluna 6, 8N COL.5; coluna 7, 8C COL.5; coluna 8, 9N COL.1; coluna 9, 10C COL.1; coluna 10, 10C COL.4; coluna 11; Controle Positivo (AV11-7); coluna 12; Controle negativo. Tamanhos de amplicons listados na **Tabela 1**.

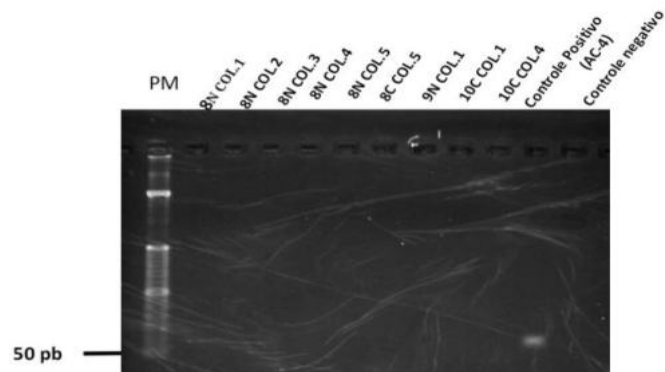


Figura 8: Amplicons PCR TetS de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus hirae*. Coluna 1, escada de DNA de 50 pb; coluna 2 8N COL.1; coluna 3, 8N COL.2; coluna 4, 8N COL.3; coluna 5, 8N COL.4; coluna 6, 8N COL.5; coluna 7, 8C COL.5; coluna 8, 9N COL.1; coluna 9, 10C COL.1; coluna 10, 10C COL.4; coluna 11; Controle Positivo (AC-4); coluna 12; Controle negativo. Tamanhos de amplicons listados na **Tabela 1**.

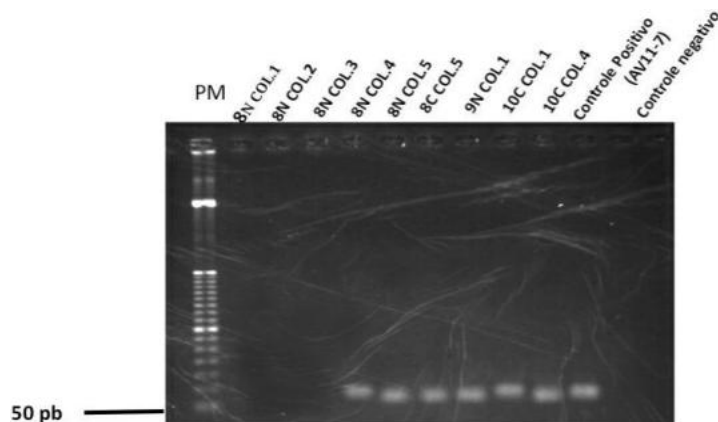


Figura 9: Amplicons PCR TetL de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus hirae*. Coluna 1, escada de DNA de 50 pb; coluna 2 8N COL.1; coluna 3, 8N COL.2; coluna 4, 8N COL.3; coluna 5, 8N COL.4; coluna 6, 8N COL.5; coluna 7, 8C COL.5; coluna 8, 9N COL.1; coluna 9, 10C COL.1; coluna 10, 10C COL.4; coluna 11; Controle Positivo (AV11-7); coluna 12; Controle negativo. Tamanhos de amplicons listados na **Tabela 1**.

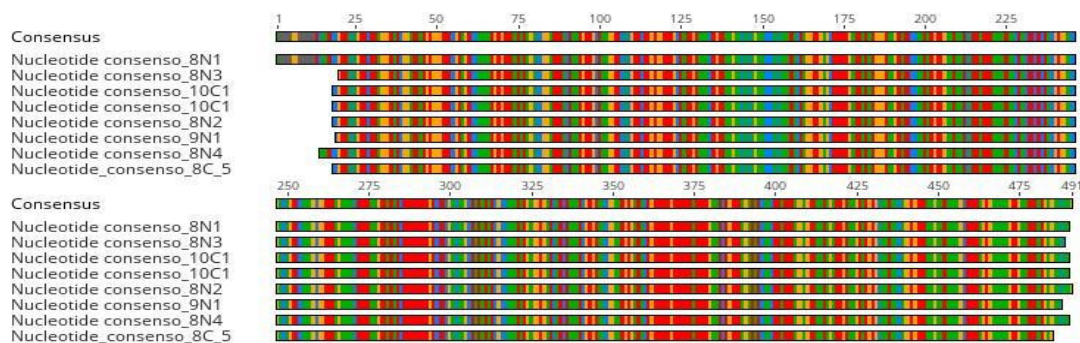


Figura 10: Consenso de base de nucleotídeos de sequenciamento Sanger do gene de resistência TetM em *E. faecalis*.

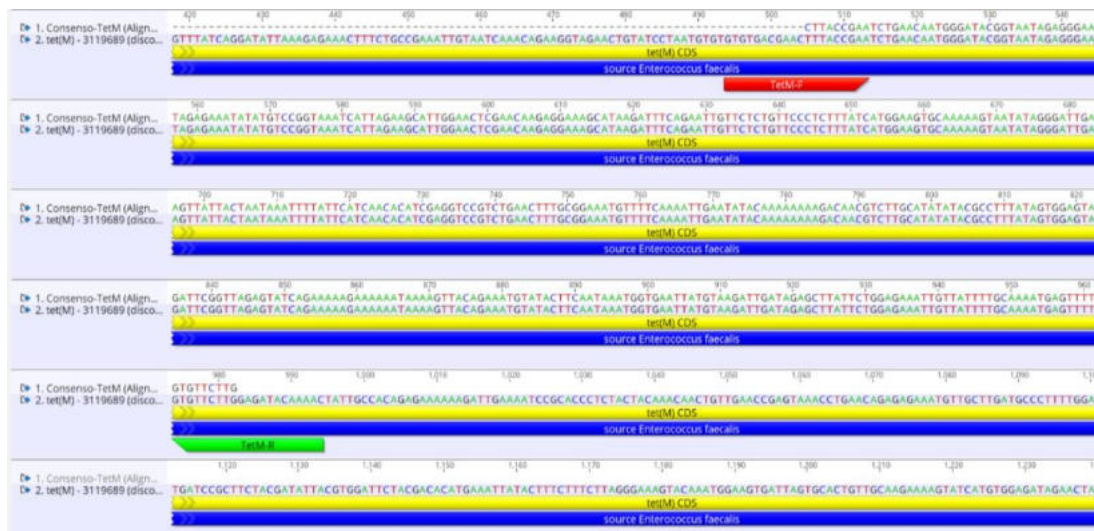


Figura 11: Comparação do consenso de nucleotídeos TetM das 8 amostras com *E. faecalis* TetM do *Geneious prime software*.

TetM	TetM + TetL	TetL
8N COL. 1	8N COL. 4	10C COL. 4
8N COL. 2	8N COL. 5	
8N COL. 3	8C COL. 5	
	10C COL. 1	

Tabela 5: Contagem de isolados positivos para os genes TetM e TetL .Pescoço-N, Cloaca- C, COL- Colônia

6. DISCUSSÃO

Enterococcus spp é um gênero de bactéria que, em seu estado não virulento, contribui para a microbiota e é comumente encontrada no sistema digestivo de humanos e animais. Devido à adaptabilidade do *Enterococcus* a uma série de condições ambientais adversas e à presença na matéria fecal, são facilmente introduzidos no meio ambiente e podem propagar (Van den Burge *et al*, 2006). Como resultado da resiliência dos *Enterococcus*, podem colonizar solo, esgotos, plantas, água, alimentos e praticamente qualquer superfície ambiental favorável (García-Solache e Rice, 2019). Em conjunto com o acima mencionado, este estudo revelou que de todos os isolados observados na **Tabela 1**, 9 foram confirmados como *E.faecalis* e 1 como *E.hirae*, dos quais 7 *E.faecalis* eram do pescoço da tartaruga-verde (ambiental) e do os 2 restantes, junto com 1 de *E.hirae*, eram da cloaca. O ocorrência de *E.faecalis* nesses isolados ambientais inferir a possível presença de poluição fecal em zonas migratórias de tartarugas-verde, uma das quais é a Praia de Itaipu em Niterói, Rio de Janeiro. A presença de *Enterococcus* spp. resistentes na Praia de Itaipu, área utilizada para atividades recreativas, pode representa uma ameaça à saúde pública, pois sabe-se que alguns *Enterococcus* causam infecções superficiais em feridas, entre outras doenças graves (Rajkumari *et al*, 2014).

Consequentemente, têm surgido preocupações em relação aos resistentes à tetraciclina, entre outros antimicrobianos, presentes no *Enterococcus* (Raza T, *et al*, 2018) e (Rivera-Gomis J *et al*, 2021). Estas preocupações crescentes, acompanhadas por aumentos na investigação, levaram à identificação de mais de 15 genes resistentes à tetraciclina presentes em *Enterococcus* spp. Um estudo de 2019 revelou que 107 cepas de *Enterococcus* - 56 isoladas de humanos e 51 de perus (*Enterococcus faecalis* 80,36% em amostras humanas e 80,39% em amostras de perus), tinham 48 (85,71%) e 48 (94,12%) de cepas humanas e de perus, respectivamente, positivo para resistência à tetraciclina (Woźniak-Biel A, *et al*. 2019). Como este estudo de 2019, todos os isolados de *E.faecalis* da tartaruga-verde foram resistentes à Tetraciclina. Além disso, o gene TetM que é responsável para proteção ribossomal, foi detectado em 82,24% de todas as cepas analisadas que corresponda aos 9 (100) % de nossos *E.faecalis* amplificados que foram positivos para o gene da tetraciclina TetM, conforme visto na **Figura 9** (Woźniak-Biel A, *et al*. 2019). Também presente em algumas amostras na **Tabela 5** foi TetL que é responsável para bomba de efluxo.

O gene resistente à tetraciclina TetM, sendo o mais detectado nos isolados do pescoço e da cloaca de *Chelonia mydas*, era também detectado nos isolados de *E.faecalis* recuperados da tartaruga marinha oliva (*Lepidochelys olivacea*) durante o estudo de caso de 2018 e exige um monitoramento (Tsai *et al*, 2018). A poluição marinha e a presença de *E.faecalis* resistente em tartarugas marinhas também ameaçam a sua saúde e a taxa de sucesso dos actuais regimes de tratamento utilizados no tratamento de infecções bacterianas em tartarugas marinhas e outras formas de vida marinha. Como resultado dessas ameaças, estudos adicionais revelaram prevalência de *E.faecalis* resistente na matéria fecal do falcão-de-pente selvagem (*Eretmochelys imbricata*) ao longo da costa sul do Brasil que foram também detectados nas amostras da nossa *Chelonia mydas* (Prichula *et al.*, 2016). Estudos adicionais também detectaram *E.faecalis* resistente a tetraciclina em amostras de tecido obtidas de tartaruga cabeçuda encalhada (*Caretta caretta*;) ao longo da costa italiana da Toscana (Fichi *et al.*, 2016). Além de ser detectado em tartarugas marinhas, e estudos também divulgaram que *E.faecalis* é extremamente comum em amostras coletadas e testadas na água do mar e isoladas de material fecal de outra vida marinha selvagem (Prichula *et al.* 2016). A detecção contínua de *E.faecalis* resistente em amostras de animais marinhos expõe problemas graves e exige atenção global/a implementação da utilização e gestão da eliminação de antimicrobianos, a fim de reverter a disseminação de bactérias e genes resistentes no nosso ambiente.

7. CONCLUSÃO

A presença de resistência de *Enterococcus* spp. previamente isolados de tartarugas-verdes, *Chelonia mydas*, da Praia de Itaipu, Niterói, RJ, foi analisados. A análise foi realizada obtendo-se 10 isolados puros de *Enterococcus* spp. de amostras por enriquecimento e isolamento, e suas identidades foram confirmadas via MALDI-TOF MS como *E.faecalis* (9 isolados) e *E.hirae* (1 isolado). Após isso, a suscetibilidade aos antibióticos foi avaliada. Avaliar em meio Müller Hinton usando diferentes classes de antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina) usando um antibiograma e o manual antibiograma 2023-CLSI do *Clinical and Laboratory Standards Institute* como referência.

Todos os 10 isolados foram resistentes à tetraciclina. A tetraciclina, e sendo uma das resistências mais comumente estudadas dentro de *Enterococcus* spp, foi selecionada como o gene alvo de interesse e foi amplificada por PCR usando os genes resistentes à tetraciclina TetM, TetL e TetS. Finalmente, utilizando o sequenciamento Sanger, o consenso revelou que 100% dos bases nucleotídeos entre o primer TetM (F e R), foram presente para cada isolado. Portanto, estes resultados inferem que genes resistentes à tetraciclina TetM estão presentes em *E.faecalis*. Embora o número de isolados utilizados durante este experimento não tenha sido suficiente para considerar a Praia de Itaipu em Niterói, Rio de Janeiro, um hotspot para tetraciclina *E.faecalis* resistente, ainda vale a pena tomar medidas de precaução para evitar a possibilidade de maior disseminação ambiental.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTIMICROBIANOS - bases teóricas e uso clínico. ANVISA. 2007. Disponível em<http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em: 23 mai. 2023.
- ARIAS, A. R. L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Revista Ciência e Saúde Coletiva*, v.12, n.1, p 61-72, 2007.
- ASLAM B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018; 11:1645-1658 <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- BARNES, A. M. T., Dale, J. L., Chen, Y., Manias, D. A., Greenwood Quaintance, K. E., Karau, M. K., Kashyap, P. C., Patel, R., Wells, C. L., & Dunne, G. M. (2017). *Enterococcus faecalis* readily colonizes the entire gastrointestinal tract and forms biofilms in a germ-free mouse model. *Virulence*, 8(3), 282–296. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1208890>
- BENTALEB, El Mehdi *et al.* “Plasmid-based high-resolution melting analysis for accurate detection of rpoB mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates from Moroccan patients.” *BMC infectious diseases* vol. 17,1 548. 7 Aug. 2017, doi:10.1186/s12879-017-2666-4
- BLAIR, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- BOECKEL, T. P. V. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.
- BRITANNICA, T. Editors of Encyclopaedia. "Polymerase chain reaction." *Encyclopedia Britannica*, December 18, 2023. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
- CANESCHI, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., & Zaghini, A. (2023). The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(3), 487. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030487>
- CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. CDC Rep. 2013
- CLSI. Performance Standards for *Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute;2023.
- DENISSEN, J, Reyneke, B, Waso-Reyneke, M, Havenga, B, Barnard, T, Khan, S, Khan, W, Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Volume 244,2022,114006, ISSN 1438-4639, <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143846392200089X>)
- ETEBU, Ebimieowei and I. Arikepar. “Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives.” (2016).
- FAIR RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2014;6. doi:10.4137/PMC.S14459
- FISHI, G, Cardeti, G, Cersini, A, Mancusi, C, Guarducci, M, G. Di Guardo, G, Terracciano, Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy, *Veterinary Microbiology*, Volume 185, 2016, Pages 56-61, ISSN 0378-1135, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.003>.
- GELBAND *et al.*, The State of the World’s Antibiotics, 2015, Center For Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP), 2015. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113516300281>)
- GOLDSTEIN, B. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*. v. 67, p.625–630, 2014.

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

GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Front. Microbiol.* v.7, n. 788, 2016.

HABBOUSH Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. 2023 Jun 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30020649.

HAIHONG, H. *et al.* Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology*. v. 5, 2014.

HOWIE, J. Penicillin: 1929–40. *British Medical Journal*, v. 293, p. 158–159, 1986.

JESUS C-S, A., Garcia-Barrientos, R., Minor-Pérez, H., Dublán-García, O. and Martin-Azocar, A. (2017) Food Safety and Antimicrobial Resistance an Approach to the Genus *Salmonella* spp. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5, 55-71. doi:10.4236/jbm.2017.52006.

JIA W, Li G, Wang W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species: A Hospital-Based Study in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014; 11(3):3424-3442. <https://doi.org/10.3390/ijerph110303424>

JONAS, O. B. *et al.* Drug-resistant infections: *A threat to our economic future* (Vol. 2). 2017. World Bank Group. Disponível em <<https://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report>> Acesso em: 18 Abril. 2023.

KOBEISSI, E., Menassa, M., Moussally, K. *et al.* The socioeconomic burden of antibiotic resistance in conflict-affected settings and refugee hosting countries: a systematic scoping review. *Confl Health* 15, 21 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13031-021-00357-6>

KOUTSOUMANIS, K. *et al.* Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. EFSA journal. *European Food Safety Authority*. v. 19, n. 6, 2021.

LHERMIE, G.; GRÖHN, Y.T.; RABOISSON, D. Addressing Antimicrobial Resistance: An Overview of Priority Actions to Prevent Suboptimal Antimicrobial Use in Food-Animal Production. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 2114, 2017.

LOHMANN K. J. *et al.* Orientation, navigation, and natal beach homing in sea turtles. In: LUTZ, P. L. The Biology of Sea Turtles. 1 ed. Boca Raton, 1996. p. 107-135.

MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*. v. 4, n. 88, 2019.

MADIGAN, M. J. *et al.* (2016). Microbiologia de Brock .14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARSHALL, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>

MOHR KI. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbial Immunol*. 2016; 398:237-272. doi: 10.1007/82_2016_499. PMID: 27738915.

MULCHANDANI R, Wang Y, Gilbert M, Van Boeckel TP (2023) Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. *PLOS Glob Public Health* 3(2): e0001305. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001305>

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. *Microbiol Spectr.* v. 4, n. 2, 2016.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nation. *The review on Antimicrobial Resistance*. 2014. Disponível em < https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf>. Acesso em: 08 abril. 2023.

ONUR Candan, Esra Deniz Candan, Bacterial diversity of the green turtle (*Chelonia mydas*) nest environment, *Science of The Total Environment*, Volume 720, 2020, 137717, ISSN 0048-9697,

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137717>.(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720312286>)

PRICHULA J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Tolfo NC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, d'Azevedo PA, Frazzon AP. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Mar Pollut Bull.* 2016 Apr 15;105(1):51-7. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.071. Epub 2016 Mar 5. Erratum in: *Mar Pollut Bull.* 2019 Apr;141:655-656. PMID: 26952995. Acesso em: 5 novembro 202023

QIAO, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment international*, 110, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>

RAJKUMARI N, Mathur P, Misra MC. Soft Tissue and Wound Infections Due to *Enterococcus* spp. Among Hospitalized Trauma Patients in a Developing Country. *J Glob Infect Dis.* 2014 Oct;6(4):189-93. doi: 10.4103/0974-777X.145253. PMID: 25538459; PMCID: PMC4265836.

RATHNYAKE IU, Hargreaves M, Huygens F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Systematic and Applied Microbiology.* 2012 Jul;35(5):326-333. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.05.004. PMID: 22742879. Acesso em: 1 novembro 2023

RAZA T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc.* 2018 May;68(5):768-772. PMID: 29885179.

READ, T. C. *et al.* Migrations of green turtles (*Chelonia mydas*) between nesting and foraging grounds across the Coral Sea. *PloS One*, v. 9, n. 6, 2014.

RITCHIE, H.; ROSER, M. Meat and Dairy Production. Our World in Data, 2017. Disponível em <>. Acesso em: 24 maio. 22023.

RIVERA-Gomis J, Marín P, Otal J, Sebastián Galecio J, Cristina Martínez-Conesa, María José Cubero, Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018, *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 186, 2021,105222, ISSN 0167-5877, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>.(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587720309065>) Acesso em: 1 novembro.2023.

SHRESTHA A, Shrestha R, Koju P, Tamrakar S, Rai A, Shrestha P, Madhup SK, Katuwal N, Shrestha A, Shrestha A, et al. The Resistance Patterns in *E. coli* Isolates among Apparently Healthy Adults and Local Drivers of Antimicrobial Resistance: A Mixed-Methods Study in a Suburban Area of Nepal. *Tropical Medicine and Infectious Disease.* 2022; 7(7):133. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7070133>

SHORT, FERNANDA S. ; LÔBO-HAJDU, GISELE ; GUIMARÃES, SUZANA M. ; LAPORT, MARINELLA S. ; **SILVA, Rosane** . Antimicrobial-Resistant Bacteria from Free-Living Green Turtles (*Chelonia mydas*). *ANTIBIOTICS-BASEL*, v. 12, p. 1268, 2023).

TISEO, K.; Huber, L.; Gilbert, M.; Robinson, T.P.; Van Boeckel, T.P. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics* 2020, 9, 918. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>

TROËNG, S. *et al.* Migration of green turtles *Chelonia mydas* from Tortuguero, Costa Rica. *Marine Biology* 148, 435–447 (2005).

TSAI M.A., Chang C.C., Li T.H. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in an endangered olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*): a case report *Indian J. Anim. Res.* (2019), 10.18805/ijar.B-1064

VAN DEN BERGHE E., De Winter T., and De Vuyst L. 2006. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int. J. Food Microbiol.* 107:159–170. Acesso em: 4 novembro.2023.

WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. 2015. Disponível em http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf Acesso em: 09 maio. 2023.

WHO, One Health. World Health Organization. 2017. Disponível em < <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>> Acesso em: 09 maio. 2023.

WHO. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization. 2019. WHO. Antimicrobial resistance. World Health Organization. 2021. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>> Acesso em: 17 maio. 2023.

WOŹNIAK-Biel A, Bugła-Płoskońska G, Burdzy J, Korzekwa K, Ploch S, Wieliczko A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Humans and Turkeys in Poland. *Microb Drug Resist*. 2019 Mar;25(2):277-286. doi: 10.1089/mdr.2018.0221. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30698495; PMCID: PMC6441282. Acesso em: 4 novembro. 2023