



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL**

MARCONE HELMER DA SILVA

**MICROBIOTA BACTERIANA ORAL E RETAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS
(PNH) CATIVOS E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

**Belém/PA
2017**

MARCONE HELMER DA SILVA

**MICROBIOTA BACTERIANA ORAL E RETAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS
(PNH) CATIVOS E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de **Mestre**.

Orientadora: Profa. Dra Hilma Lúcia Tavares Dias.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio.

**Belém/PA
2017**

MARCONE HELMER DA SILVA

**MICROBIOTA BACTERIANA ORAL E RETAL DE PRIMATAS NÃO HUMANOS
(PNH) CATIVOS E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de **Mestre**.

Área de concentração: Análises Clínicas

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hilma Lúcia Tavares
Núcleo de Ciências Agrárias e
Desenvolvimento Rural / UFPA
Orientadora

Prof. Dr. Fernando Elias Rodrigues da
Silva
Universidade Federal Rural da
Amazônia / UFRA
Membro Titular Externo

Dra. Karol Guimarães Oliveira
Centro Nacional de Primatas / CENP
Membro Titular Externo

Dra. Natalia Inagaki de Albuquerque
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária/EMBRAPA
Membro Titular Externo

Prof. Dr. Moyses Hamoe
Universidade Federal do Pará/UFPA
Membro Suplente Interno

Aos meus pais Maria Luiza Helmer e Ednaldo da Silva
(*in memoriam*) e ao meu Irmão Ednaldo da Silva Filho,
com muito amor **DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão:

A minha Mãe, meu Pai e meu Irmão pelos ensinamentos de Amor e lições de vida;

As Professoras orientadoras Dra. Hilma Lúcia Tavares e Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio, pela orientação, ensinamentos, paciência e competência que contribuíram para minha formação, de cada aprendizado durante esta caminhada, muito obrigada;

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP), Serviço de Ecologia e Manejo de Primatas (SEEMP), Seção de Laboratório (SALAB) pela infraestrutura do local e apoio logístico. Aos médicos veterinários, Wellington Bandeira, Aline Imbeloni e Dr. Muniz;

Aos professores e funcionários do PPGMACPRO/UFPA que contribuíram de alguma maneira;

Aos Técnicos e Amigos do SEEMP: Carla, Rafael, Dojean, Lorena, Sheila, Obadias e Souzimar.

Aos meus queridos sobrinhos caninos: Lord, Leidy, Maat e ao irmão adotivo mas novo Madruga.

A minha querida esposa Flávia e minha Cunhadex Nara;

Aos Meus Amigos do Sideral.

Meu muito obrigado a todos!!

Resumo

Os objetivos desta pesquisa foram identificar bactérias isoladas da cavidade oral e da ampola retal, nas espécies *Saimiri colinsii* e *Callithrix jacchus* e determinar a sensibilidade a 16 antimicrobianos. Trinta indivíduos de cada espécie foram analisados e foram isoladas 136 bactérias em *C. jacchus* e 84 em *S. collinsi*. As bactérias mais isoladas em *S. colinsii* foram *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Raoutella ornithinolytica*, *Staphylococcus xylosus* e *Proteus mirabilis*. Já em *C. jacchus* as espécies *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Serratia marcescens* e *S. xylosus* foram mais isoladas na cavidade oral e ampola retal. O teste de sensibilidade mostrou que dentre as cepas isoladas os maiores percentuais de resistência foram observados na ampicilina, amoxicilina, cefalotina e nitrofurantoina. Na cavidade oral de ambas as espécies as cepas foram sensíveis a ceftazidima, ceftriaxona, meropenem, amicacina, levofloxacina e a sulfametoxazol/trimetoprim. Na ampola retal os isolados foram sensíveis a cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem, meropenem, amicacina e levofloxacina. Conclui-se que as espécies de *S. colinsii* e *C. jacchus* apresentam em sua microbiota oral e retal composta por várias espécies bacterianas e que a resistência pode ser um problema no criatório, uma vez que as cepas mostraram percentuais elevados de resistência a diferentes antimicrobianos.

Palavras chave: Microbiologia, *Callithrix jacchus*, *Saimiri colinsii*, Amazônia, Antibióticos.

Abstract

The aims of this work were to identify bacteria isolated from oral cavity and rectal ampoule in the *Saimiri colinsii* and *Callithrix jacchus* species and to determine the susceptibility profile to 16 anti-microbial. Thirty individuals of each species were analyzed and were isolated 136 bacteria in *C. jacchus* and 84 in *S. collinsi*. The isolated bacteria most frequent in *S. colinsii* were *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Raoutella ornithinolytica*, *Staphylococcus xylosus* and *Proteus mirabilis*. The bacteria isolated in *C. jacchus* were *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Serratia marcescens* and *S. xylosus* in oral cavity and rectal ampoule. Results of sensibility tests demonstrated that among isolated strains from oral cavity and rectal ampoule the highest percentages of resistance were observed against ampicillin, amoxicillin, cephalothin and nitrofurantoin. The oral cavity in both species, the strains were sensitive to ceftazidime, ceftriaxone, meropenem, amikacin, levofloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim. In rectal ampoule the isolates were sensitive to cefoxitin, ceftazidime, ceftriaxone, ertapenem, meropenem, amikacin and levofloxacin. Therefore, in *S. colinsii* e *C. jacchus* presented in their oral and rectal microbiota constituted by several bacteria species and that resistance may be a problem on captive, since that strains demonstrated high percentages of resistance to different anti-microbial.

Keywords: Microbiology, *Callithrix jacchus*, *Saimiri colinsii*, Amazon, Antibiotics.

Introdução

No reino animal os primatas não humanos (PNH), devido à similaridade filogenética com a espécie *Homo sapiens*⁽¹⁾ tornaram-se excelentes modelos experimentais utilizados em pesquisas biomédicas⁽²⁾. Esses animais são geralmente os melhores ou, às vezes, os únicos modelos para estudar determinadas doenças em humanos, bem como para elaboração de estratégias de prevenção e terapias⁽¹⁾.

A microbiota refere-se à população de microrganismos (bactérias, vírus, protozoários e fungos) que habitam a pele e as mucosas do corpo humano ou animal, mantendo uma relação de homeostase⁽³⁾. Ela é determinada por fatores como raça, idade, hormônios, dieta, estresse, comportamento sexual, medicação, sazonalidade reprodutiva, localização geográfica, densidade populacional, contato animal e procedimentos de limpeza⁽⁴⁾.

A importância do conhecimento da constituição da microbiota em PNH criados em cativeiro está na prevenção de possíveis infecções e complicações clínicas. O contato direto entre o animal e o ser humano parece ser então, um dos fatores de risco para o aparecimento de animais colonizados por patógenos, sendo que esta colonização não significa necessariamente doença⁽⁵⁾.

A microbiota residente em mamíferos é estabelecida pela interação entre o hospedeiro e o meio ambiente⁽⁶⁾. Além disso, as interações hospedeiro-microrganismo podem ser comensais, mutualísticas, patogênicas ou parasitárias, e essas interações são conhecidas por influenciar o metabolismo, desenvolvimento e o estado imunológico dos animais⁽⁷⁾.

Em PNH saudáveis, as bactérias são normalmente encontradas principalmente na mucosa oral, fossas nasais e pele⁽⁸⁾, podendo a partir desses locais, alcançar outras regiões da pele e mucosas, ou produzir infecção local quando as barreiras naturais estão comprometidas por trauma ou cirurgia⁽⁹⁾. Contudo, a composição da microbiota de PNH ainda é pouco conhecida⁽¹⁰⁾.

Neste trabalho objetivou-se isolar e identificar as bactérias presentes na cavidade oral e na ampola retal de PNH sadios das espécies *Saimiri collinsi* e *Callithrix jacchus* criados em cativeiro no Centro Nacional de Primatas na Amazônia Oriental, e testar a susceptibilidade das bactérias a antibióticos.

Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IEC) do Instituto Evandro Chagas, sob o protocolo

nº 07/2016, e seguiram todas as orientações contidas na resolução nº 1, de 9 de julho de 2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal Ministério da Ciência e Tecnologia (CONCEA-MCT). Quanto aos aspectos de biossegurança, os profissionais envolvidos utilizaram os equipamentos de proteção individual e coletiva pertinente, seguindo os procedimentos operacionais da instituição.

O estudo foi realizado dentro das instalações físicas do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS): Seção de Laboratório (SALAB) e Serviço de Ecologia e Manejo de Primatas (SEEMP), localizado às margens da rodovia BR-316, Km 7, no município de Ananindeua, região Metropolitana de Belém – Pará - Brasil (1°22'33''S/ 48°22'33'' W).

Os animais selecionados pertencem ao plantel reprodutivo do CENP e durante a execução do experimento, permaneceram sob as mesmas condições de cativeiro nos galpões, ou seja, em recintos de alvenaria revestidos com lajota (3,85 x 2,00 x 2,40 m), tela de aço, poleiros de cano e madeira, cama com 20 cm de maravalha (pó de serragem) autoclavada e agrupados com uma média de cinco animais por recinto. A higienização e sanitização das instalações e equipamentos eram realizadas mensalmente, com a retirada da cama de maravalha, lavagem dos recintos com sabão e hipoclorito de sódio a 3%, amônia quaternária, conforme as regulamentações prescritas nos procedimentos operacionais padronizados (POPs) e medidas de biossegurança estabelecidos na instituição.

Foram utilizados na pesquisa 60 PNH, clinicamente sadios, sendo 30 animais da espécie *Saimiri collinsi* (15 machos e 15 fêmeas) e 30 *Callithrix jacchus* (15 machos e 15 fêmeas), pertencentes a duas faixas etárias (Juvenil – até 2 anos e Adulto – acima de 2 anos). Todos os animais estavam sujeitos ao fotoperíodo natural e recebiam alimentação diária balanceada à base de hortifrutigranjeiros, ração peletizada específica para primatas neotropicais (MEGAZOO® P18, Proteína 18%, Fibra Máx. 6,5%, Betim – MG), suplementos vitamínicos, minerais e água *ad libitum*.

As colheitas das amostras foram realizadas nos recintos dos animais com os mesmos sendo contidos fisicamente, com auxílio de um puçá e luva de raspa de couro. Para minimizar o estresse e resguardar o bem-estar dos animais foram monitoradas a frequência respiratória (FR) e a frequência cardíaca (FC). Durante a colheita das amostras havia sempre a presença de, pelo menos, um médico veterinário para a verificação do estado de saúde do animal manipulado e, cada animal possuía uma ficha individual para registro dos dados.

Foram utilizados *swabs* estéreis para as colheitas de ambas as cavidades, sendo imediatamente encaminhados ao laboratório de Microbiologia do CENP para realização das análises bacteriológicas.

O isolamento bacteriano da cavidade oral e ampola retal foram realizados com as amostras semeadas em placas de Petri com meio de Ágar base Sangue (Difco®), enriquecido com 5% (v/v) de sangue desfibrinado de ovino e Ágar MacConkey (Difco®) sendo incubadas a temperatura de 37°C em intervalo de tempo de 24 até 72 horas. Além disso, nas amostras oriundas da ampola retal foi realizada a semeadura em placas de Petri com

Agar MacConkey (MC) e Agar Salmonella-Shigella (SS), incubados a 37°C entre 24 e 72 horas. Para a identificação dos isolados foram selecionadas colônias que posteriormente seguiram para avaliação das características morfotintoriais, de acordo com este resultado foram realizados testes de oxidase e catalase.

Adicionalmente, as colônias obtidas das amostras oriundas das cavidades foram repicadas em placas de Petri com Ágar Nutriente e após incubação a 37°C durante 24 horas foram suspensas em tubos contendo 3 mL de solução salina estéril a 0,45%, e posteriormente diluídas até a concentração de 0,53 - 0,63 da escala de MacFarland para a identificação bioquímica pela metodologia automatizada, utilizando o equipamento VITEK Compact II bioMérieux®. As identificações foram feitas utilizando-se cartões de identificação: GPI Card bioMérieux® (*Gram positive identification*) para Gram positivos e GNI Card bioMérieux® (*Gram negative identification*) para Gram negativos.

Cada cartão de identificação contém 30 substratos bioquímicos liofilizados, que foram reidratados com suspensão bacteriana contendo 10⁵ UFC/mL, preparadas a partir das colônias de bactérias isoladas das amostras coletadas. Os cartões foram inseridos no equipamento, o qual faz leitura individual de cada poço a cada 30 minutos através da colorimetria, analisando as mudanças de coloração o equipamento define um perfil e os resultados são comparados a perfis bacterianos armazenados em sua memória.

Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados utilizando o sistema automatizado VITEK Compact II (bioMérieux®), através da retirada de 50 a 200 µL de inóculos bacterianos, da solução previamente preparada para a fase de identificação, seguida de nova diluição em 2,8 mL de solução salina a 0,45%, e leitura à escala de MacFarland para escolha dos cartões diagnósticos que contenham os seguintes antibióticos ampicilina, amoxicilina /ácido clavulânico, cefalotina, cefoxitina,

cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina, nitrofurantoina e sulfanetoxazol/trimetoprim.

Todos os dados de cepas bacterianas foram tabulados no Microsoft Office Excel 2010, e determinados os valores relativos a partir dos valores observados. Foi estimado o índice de Shannon para determinação do grau de biodiversidade bacteriana por local (oral e ampola retal) e por faixa etária (jovens e adultos) através da fórmula abaixo:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Onde p_i é a frequência relativa de cada cepa bacteriana. Os antibiogramas foram descritos na forma de gráficos, referindo às frequências relativas de cepas resistentes, indeterminadas e sensíveis, de acordo com os gêneros mais relevantes (maior frequência de isolamento), entre as bactérias orais e retais.

Resultados

Um total de 221 bactérias foi isolado das amostras da cavidade oral e ampola retal de *C. jacchus* (n=136) e *S. collinsi* (n=84). Sendo identificadas 32 espécies bacterianas, no qual foi observada a predominância de espécies Gram negativas (29) e somente três espécies Gram positivas.

De 84 bactérias isoladas de *S. collinsi*, foram identificadas 16 espécies e destas 11 provenientes da cavidade oral e oito oriundas da ampola retal. Na cavidade oral de animais juvenis foi observada uma maior frequência das espécies Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* 5 (56%), *Staphylococcus xylosum* 3 (39%), *Pseudomonas putida* 1 (11%) e *Raoultella ornithinolytica* 1 (11%). Já nos adultos prevaleceram *K.pneumoniae* 13 (62%), *Enterobacter cloacae* 3 (14%), *Escherichia coli* 3 (14%) e *R. ornithinolytica* 4 (19%). Com relação às bactérias da ampola retal de animais juvenis foram identificadas seis espécies com predominância da *K. pneumoniae* 3 (33%), *E.cloacae* 2 (22%), *E. coli* 5 (56%) e *Staphylococcus hominis* 2 (22%). Já nos adultos foram isoladas sete espécies com destaque para *K. pneumoniae* 10 (48%), *E. cloacae* 4 (19%), *E. coli* 9 (43%) e *Proteus mirabilis* 4 (19%). Não foram observadas diferenças no número e na diversidade das espécies bacterianas isoladas de acordo com o sexo. Na

cavidade oral de *S. collinsi* a diversidade de espécies avaliada pelo Índice de Shannon-Wiener, demonstrou diferença na diversidade de espécies bacterianas na variável estudada (juvenil 1,17 e adulto 1,88), sendo maior nos adultos. Já com relação à ampola retal, houve também maior diversidade em adultos (juvenil 1,63 e adulto 1,65), estando representados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies bacterianas identificadas da cavidade oral e ampola retal de 30 indivíduos da espécie *S. collinsi*, mantidos em cativeiro no CENP – Ananindeua/PA.

Bactérias	Cavidade oral			Ampola retal		
	Juvenis n=9	Adultos n=21	Total	Juvenis n=9	Adultos n=21	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0 (0)	1 (5)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0 (0)	1 (5)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Citrobacter koseri</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (3)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11)	1 (5)	2 (7)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0)	3 (14)	3 (10)	2 (22)	4 (19)	6 (20)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	3 (14)	3 (10)	5 (56)	9 (43)	14(47)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11)	2 (10)	3 (10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (56)	13 (62)	18 (60)	3 (33)	10 (48)	13(43)
<i>Pantoea agglomerans</i>	0 (0)	2 (10)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (19)	4 (13)
<i>Pseudomonas aeruginosus</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas putida</i>	1 (11)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Raoute lla ornithinolytica</i>	1 (11)	4 (19)	5 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3 (33)	1 (5)	4 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Streptococcus gordonii</i>	0 (0)	1 (5)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Staphylococcus hominis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22)	0 (0)	2 (7)
Total de Cepas	10	29	39	14	31	45
Nº de espécies/Grupo	4	10	11	6	7	8
Índice de Shannon-Wiener	1,17	1,88	1,84	1,63	1,65	1,75

Para a *C. jacchus*, foram isoladas 26 espécies bacterianas, destas 17 da cavidade oral e 18 da ampola retal. Nos juvenis foram isoladas 10 espécies de bactérias na cavidade oral com predominância de *E. cloacae* 3 (37,5%), *E. coli* 5 (62,5%), *K. pneumoniae* 2 (25%) e *Serratia marcescens* 1 (12,5%). Já nos adultos foram isoladas 15 espécies bacterianas sendo as de maior ocorrência *E. cloacae* 10 (45,5%), *E. coli* 5 (22,7%), *K. pneumoniae* 11 (50,0%) e *S. marcescens* 5 (22,7%). Em relação às bactérias isoladas da ampola retal, foram identificadas 15 espécies nos juvenis com

predominância de *K. pneumoniae* 8 (100,0%), *K. oxytoca* 3 (37,5%) *E. coli* 7 (87,5%) e *S. xylosum* 1 (12,5%). Os adultos foram identificados 10 grupos de bactérias com destaque: *K. pneumoniae* 14 (63,6%), *E. coli* 16 (72,7%) e *S. xylosum* 3 (13,6%). A diversidade de espécies avaliada pelo Índice de Shannon-Wiener, na cavidade oral, demonstrou diferença nas variáveis estudadas (juvenil 1,8 e adulto 1,4), sendo maior diversidade de espécies nos juvenis. Já com relação à ampola retal, também se mostrou maior nos jovens (juvenil 1,5 e adulto 1,3) como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2- Espécies bacterianas identificadas da cavidade oral e ampola retal de 30 indivíduos da espécie *C. jacchus*, mantidos em cativeiro no CENP – Ananindeua/PA.

Bactérias	Cavidade oral			Ampola retal		
	Juvenis n=8	Adultos n=22	Total	Juvenis n=8	Adultos n=22	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1(12,5)	1 (4,5)	2 (6,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1(12,5)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Citrobacter farmeri</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)
<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)	2 (25,5)	1 (4,5)	3 (9,9)
<i>Citrobacter youngae</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	1 (4,5)	2 (6,6)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1(12,5)	1 (4,5)	2 (6,6)	1 (12,5)	1 (4,5)	2 (6,6)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3(37,5)	10(45,5)	13 (43,3)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Escherichia coli</i>	5(62,5)	5 (22,7)	10 (33,3)	7 (87,5)	16(72,7)	23(76,6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2(25,0)	11(50,0)	13(43,3)	8(100,0)	14(63,6)	22(73,3)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1(12,5)	2 (9,0)	3 (9,9)	3 (37,5)	0 (0)	3 (9,9)
<i>Kluyvera cryococces</i>	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Hafnia alvei</i>	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pantoea spp</i>	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (0)	2 (9,0)	2 (6,6)	1 (12,5)	2 (9,0)	3 (9,9)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (25,5)	0 (0)	2 (6,6)
<i>Pseudomonas putida</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Pseudomonas rettgeri</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1(12,5)	2 (9,0)	3 (9,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Raoutella planticola</i>	0 (0)	2 (9,0)	2 (6,6)	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)
<i>Serratia fonticola</i>	1(12,5)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	1(12,5)	5 (22,7)	6 (20,0)	1 (12,5)	0 (0)	1 (3,3)
<i>Shigomonas paucimobilis</i>	0 (0)	1 (4,5)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	3 (13,6)	4 (13,3)
Total de Cepas	17	46	63	32	41	73
Nº de espécies/Grupo	10	15	17	15	10	18
Índice de Shannon-Wiener	1,8	1,4	1,5	1,5	1,3	0,9

Para determinar o perfil de susceptibilidade das bactérias frente aos antimicrobianos foram selecionadas as bactérias que apresentaram maiores frequências de identificação, destacando-se *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Raoutella* spp. e *Serratia* spp..

Na cavidade oral (Figura 1) as cepas bacterianas isoladas foram sensíveis à ceftazidima, cefalotina, ertapenem, meropenem, ampicacina, levofloxacina, nitrofurantoína, gentamicina e sultametoxazol/trimetoprim. Adicionalmente todas as bactérias apresentaram elevados percentuais de resistência frente a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefoxitina, ácido nalidíxico e nitrofurantoína. A espécie *E. coli* apresentou elevado percentual de sensibilidade frente os antibióticos analisados.

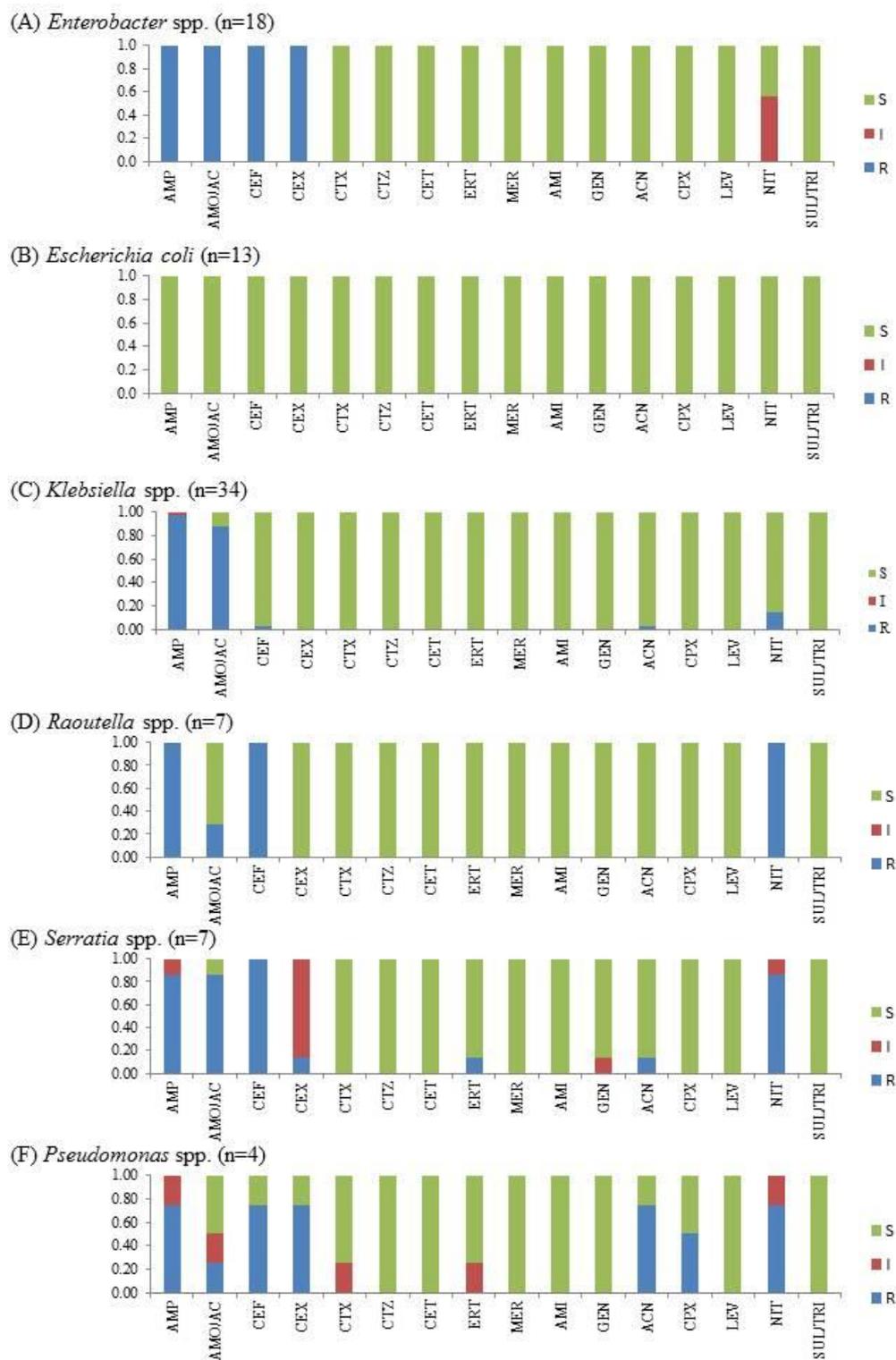
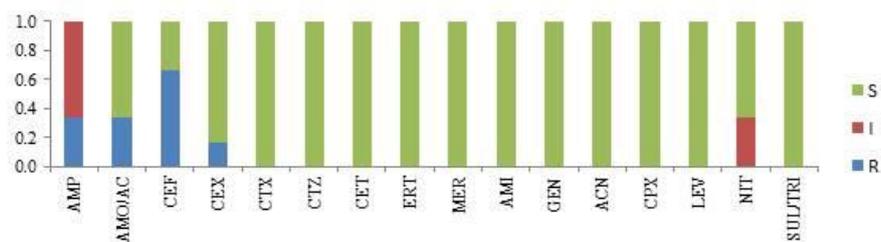


Figura 1. Perfil de susceptibilidade de 16 antibióticos frente a seis espécies bacterianas da cavidade oral de *S. collinsi* e *C. jacchus*. AMP= ampicilina, AMO/AC= amoxicilina/ ac. clavulânico, CEF= cefalotina CEX= cefoxitina, CTX= cefotaxima, CTZ= ceftazidima, CET= ceftriaxona, ERT= ertapenem, MER= meropenem, AMI= amicacina, GEN= gentamicina, ACN= ac. nalidixico, CPX= ciprofloxacina, LEV=

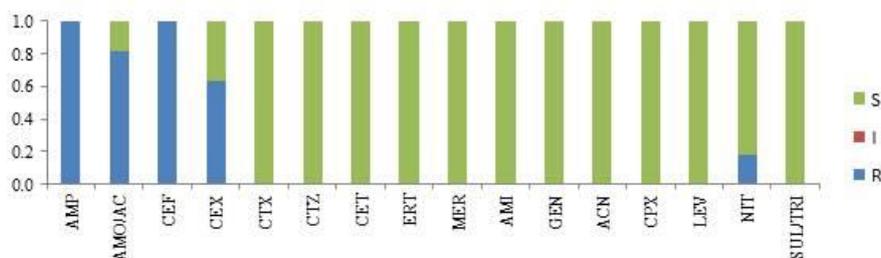
levofloxacina, NIT= nitrofurantuína e SUL/TRI= sulfametoxazo/trimetoprim, S – Sensível, I – Indeterminado e R – Resistente.

Em relação aos resultados do antibiograma de isolados da ampola retal (Figura 2) as espécies *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, apresentaram elevados percentuais de resistência frente a ampicilina, amoxicilina cefalotina, cefoxitina, nitrofurantuína, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina sulfametoxazol/trimetoprim. As espécies de *Klebsiella* spp. apresentaram elevados percentuais de resistência a ampicilina e foi sensível a cefotaxima, amicacina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina e a sulfametoxazol/trimetoprim. Todas as espécies bacterianas apresentaram elevada sensibilidade a cefotaxima e amicacina.

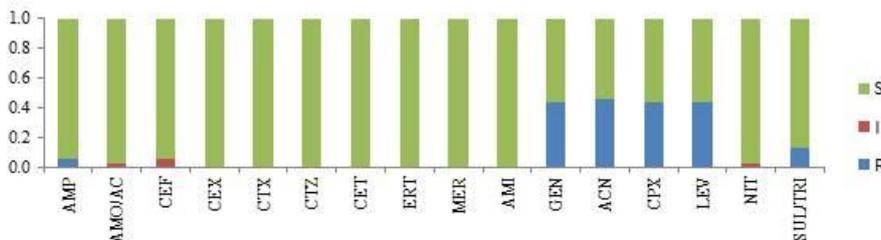
(A) *Citrobacter* spp. (n=6)



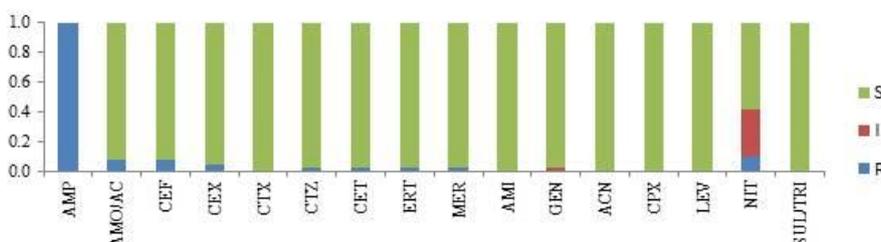
(B) *Enterobacter* spp. (n=11)



(C) *Escherichia coli* (n=37)



(D) *Klebsiella* spp. (n=41)



(E) *Proteus mirabilis* (n=7)

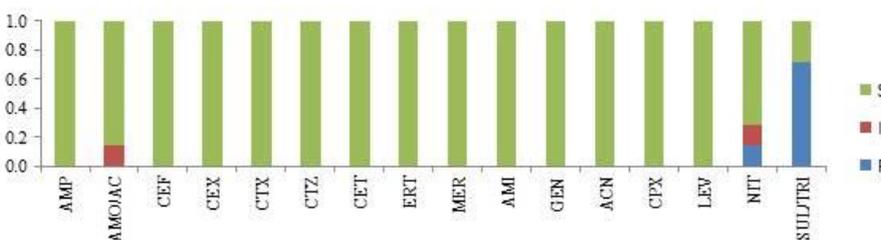


Figura 5 - Perfil de susceptibilidade de 16 antibióticos frente a cinco espécies bacterianas isoladas da ampola retal de *S. collinsi* e *C. jacchus*. AMP= ampicilina, AMO/AC= amoxicilina/ac. clavulânico, CEF= cefalotina, CEX= cefoxitina, CTX= cefotaxima, CTZ= ceftazidima, CET= ceftriaxona, ERT= ertapenem, MER= meropenem, AMI= amicacina, GEN= gentamicina, ACN= ac. nalidixico, CPX=

ciprofloxacina, LEV= levofloxacina, NIT= nitrofurantoina e SUL/TRI= sulfametoxazol/trimetoprim, S – Sensível, I – Indeterminado e R – Resistente.

Discussão

Neste estudo foram encontradas diversas espécies bacterianas, evidenciando a variação inter-individual da composição bacteriana da cavidade oral e da ampola retal. Segundo Avalos-Télez et al.⁽¹¹⁾, esta composição bacteriana é decorrente da interação entre o hospedeiro e o meio ambiente que estabelece a microbiota normal desses animais. A maior ocorrência de bactérias foi de Gram negativas, o que de acordo com Brasil⁽¹²⁾, os 12 gêneros isolados: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Serratia*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus*, possuem importância clínica à saúde animal e à saúde pública e, podem estar associados às mais diferentes patologias nos mais diversos sítios do organismo humano e animal.

O isolamento dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Proteus* a partir da cavidade oral e da ampola retal das espécies estudadas, também foram relatadas por Verona⁽¹³⁾ analisando a cavidade oral e o ânus de saguis (*C. jacchus*) de vida livre no Rio de Janeiro e foram consideradas bactérias comensais do trato gastrointestinal.

A análise dos dados demonstrou que *E. coli* e *Klebsiella* spp. prevaleceram nos isolados da cavidade oral e na ampola retal nas duas faixas etárias analisadas. Do mesmo modo, estas bactérias foram isoladas por Mugisha et al.⁽¹⁴⁾, a partir da cavidade oral de chimpanzés saudáveis mantidos em um santuário Africano. Entretanto, Galera et al.⁽¹⁵⁾, isolaram *Klebsiella* sp. da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Sapajus apella*) e macacos bugios (*Alouatta caraya*) saudáveis. A *Klebsiella* spp. é encontrada no intestino e na cavidade oral normal em muitos PNH, mas as infecções causadas a partir de estirpes patogênicas podem causar morbidade e mortalidade significativa nesses animais⁽⁸⁾. David et al.⁽¹⁶⁾, também isolaram *E. coli* e *K. pneumoniae* de amostras coletadas durante exames *post-mortem* de *C. jacchus* que apresentavam colite e de micos (*Saguinus* spp.) com peritonite.

Segundo Ludlage e Mansfield⁽¹⁷⁾, *E. coli* é um dos principais causadores de diarreia hemorrágica em colônias de *C. jacchus* mantidos em cativeiro, e a presença de portadores assintomáticos é comum na infecção por esse microrganismo, ainda segundo esses autores a infecção por *E. coli* pode persistir por vários anos, mesmo após a realização do tratamento, sendo que a contaminação se dá pela via fecal-oral e as

principais formas de introdução desse patógeno em colônias de saguis cativos são fômites contaminados e o contato com o homem ou PNH contaminados.

Através de métodos moleculares, Carvalho et al.⁽¹⁸⁾ identificaram *E. coli* enteropatogênica em amostras coletadas com *swabs* do reto e cólon de primatas neotropicais (*Callithrix* sp., *Alouatta fusca* e *Saguinus fuscicollis*) sem sinais clínicos de doença entérica, e em animais que vieram a óbito com diarreia e/ou enterite. Esses autores sugeriram que PNH podem ser reservatórios naturais de *E. coli* e, portanto, representam fontes de infecção desse microrganismo para outros PNH e para o homem.

A *K. pneumoniae* apresentou-se com maior frequência de isolados nas duas espécies estudadas, sendo que nos *S. colinsii*, houve diferença significativa nos isolados orais entre as variáveis juvenil e adulto. Na espécie *C. jacchus*, houve diferença nas variáveis da cavidade oral e retal. Em um estudo, Verona⁽¹³⁾ isolou *K. pneumoniae* a partir de *swabs* orais de *C. jacchus* saudáveis de vida livre e de cativeiro. Contudo, Pisharath et al.⁽¹⁹⁾ descreveram a ocorrência de septicemia e peritonite secundária à infecção por *K. pneumoniae* em seis exemplares de *C. jacchus* mantidos em cativeiro nos EUA.

O gênero *Enterobacter*, pode ser classificado como patógeno oportunista, ou seja, raramente pode causar doença⁽²⁰⁾. Neste estudo *E. aerogenes* e *E. cloacae* estiveram presentes em ambas espécies, sendo que *E. cloacae* apresentou maior frequência em *C. jacchus*. As duas espécies já foram relatadas por Loureiro et al.⁽²¹⁾, em um estudo com *Sapajus apella*, ao analisarem 38 animais.

Com relação à análise do Índice de Shannon-Wiener, verificou-se uma diferença de diversidades de espécies bacterianas encontradas em *S. colinsii*, tanto na cavidade oral quanto na ampola retal. Na espécie *C. jacchus*, também houve diferença entre a cavidade oral e a ampola retal. Da Silva et al.⁽²²⁾, em um estudo com *A. azarai* criados em cativeiro, observou uma maior diversidades de bactérias encontradas em machos ($H' = 2,16$) do que em fêmeas ($H' = 1,68$).

As análises dos dados demonstraram que entre os isolamentos de bactérias Gram positivas coagulase-negativas foram encontrados as espécies *S. xylosuse* *S. hominis*. Da Silva et al.⁽²²⁾ também encontraram espécies de estafilococos colonizando as mucosas vaginal e prepucial de macacos da noite (*Aotus azarai infulatus*) mantidos em cativeiro. Segundo os autores, 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.

Com relação ao perfil de sensibilidade e resistência observou-se que os antibióticos ampicilina, amoxicilina e a cefalotina, obtiveram os maiores percentuais de resistência dentre as bactérias isoladas da cavidade oral, exceto a *E. coli* que mostrou elevada sensibilidade a todos os 16 antibióticos analisados. Resultados semelhantes foram encontrados por Da Silva et al.⁽²²⁾ ao observarem que *E. coli* apresentou elevada sensibilidade a 17 antibióticos utilizados no estudo.

Para as bactérias isoladas na ampola retal, os isolados de *Enterobacter* spp. apresentaram elevados percentuais de resistência frente a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, ceftiofina. Já o gênero *Klebsiella* apresentou elevada resistência frente a ampicilina, o que foi ratificado por Da Silva et al.⁽²²⁾, ao observar maior resistência ao mesmo antibiótico. Segundo Magiorakos et al.⁽²³⁾, as bactérias resistentes a um ou mais antimicrobianos em três ou mais classes de antimicrobianos são definidas como multirresistentes.

Conclusão

Conclui-se que as espécies de *S. colinsii* e *C. jacchus* apresentam em sua microbiota oral e retal composta por várias espécies bacterianas e que a resistência pode ser um problema no criatório, uma vez que as cepas mostraram percentuais elevados de resistência a diferentes antimicrobianos.

Agradecimentos

Somos extremamente gratos ao Centro Nacional de Primatas e à Universidade Federal do Pará pela colaboração, execução e idealização desta pesquisa.

Referências

1. Abee CR. Alternative New World Primate Models for Non-AIDS Research. *ILAR Journal*. 2003;44:231-235.
2. Wright EM, Bush DE. The reproductive cycle of the Capuchin (*Cebus apella*). *Laboratory Animal Science*. 1977;27:651-654.
3. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*. 2004;93:97-108.

4. Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*. 2001;32:227-241.
5. Weese JS, Van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2010;140:418–429.
6. Linhares IM, Giraldo PC, Baracat EC. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010;56:370-374.
7. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9:313–23.
8. Simmons J, Gibson S. Bacterial and mycotic diseases of nonhuman primates. In: Abee RC, Mansfield K, Tardif S, Morris T. *Nonhuman Primates in Biomedical Research*. 2nd ed. London: Elsevier 2012. p. 105-172.
9. Robert S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Internal Medicine Journal*. 2005;35:97-105.
10. Menezes-Costa A, Machado-Ferreira E, Voloch CM, Bonvicino CR, Seuánez HN, Leoncini O, Soares CAG. Identification of Bacterial Infection in Neotropical Primates. *Microbiology Ecology*. 2013;66:471-478.
11. Avalos-Télliez R, Suárez-Güemes F, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R. Bacteria and yeast normal microbiota from respiratory tract and genital area of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). In: Mendez-Vilas A. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2nd ed. Bandajoz: Formatex; 2010. p. 666-673.
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. 1st ed. Brasília: Editora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2004. 9p.
13. Verona CES. Parasitos em sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Tese de Doutorado em Saúde Pública-Fundação Oswaldo Cruz; 2008 Oct 01 [cited 2017 abril 20]. Available from: http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/25482_Veronacesd.pdf
14. Mugisha L, Köndgen S, Kaddu Mulindwa D, Gaffikin L, Leendertz FH. Nasopharyngeal colonization by potentially pathogenic bacteria found in healthy semi- captive wild- born chimpanzees in Uganda. *American Journal of Primatology*. 2014;76:103-110.
15. Galera PD, Ávila MO, Ribeiro CR, SANTOS FV. 2002. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-pregos (*Cebus apella* Linnaeus, 1758) e macacos bugio (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812), provenientes do reservatório de Manso-MT, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2002;69:33-36.
16. David JM, Dick JR EJ, Gene E, Hubbard B. Spontaneous pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and tamarins (*Saguinus oedipus*, *Saguinus mystax*). *Journal of Medical Primatology*. 2009;38:347–359.
17. Ludlage E, Mansfield KG. Clinical care and diseases of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Comparative Medicine*. 2003;53:369-382.
18. Carvalho VM, Gyles CL, Ziebell K, Ribeiro MA, Catão-Dias JL, Sinhorini IL, De Castro AFP. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41:1225-1234.
19. Pisharath HR, Cooper TK, Brice AK, Cianciolo RE, Pistorio AL, Wachtman LM, Mankowski JL. Iniciante CE Septicemia e peritonite em uma colônia de *Callithrix jacchus* (*Callithrix jacchus*) secundárias à infecção *Klebsiella pneumoniae*. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. 2005;

20. Quinn PJ, Markeu BK, Carter NE, Donnelly WJ, Leonard EC. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. 1st ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2005. 512p.
21. Loureiro ECB, Muniz JAPC, Kingston WR. Enterobactérias detectadas em primatas capturados na região amazônica do Brasil. Revista Fundação SESP. 1985;30:121-126.
22. da Silva GA, Monteiro FOB, Dias HLT, Cavalcante RO, Sampaio AIF, da Conceição MEBAM, Takeshita RSC, de Castro PHG, Feijó FMC, Rahal SC. Qualitative analysis of preputial and vaginal bacterial microbiota in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) raised in captivity. Journal of Medical Primatology. 2013;42:71–78.
23. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection. 2011;18:268–281.