

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

BRUNA TALITA FATORETTO

Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de mico-leão-preto
***Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823)**

SÃO PAULO

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

BRUNA TALITA FATORETTO

Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de mico-leão-preto
***Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna, para obtenção do título de mestre em Conservação da Fauna.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Locosque Ramos.

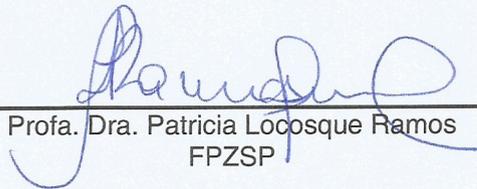
SÃO PAULO

2019

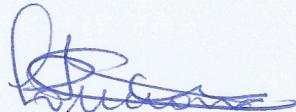


Folha de Aprovação

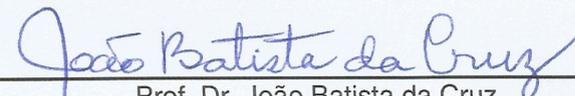
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Talita Faretto, realizada em 22/05/2019:



Profa. Dra. Patricia Locosque Ramos
FPZSP



Profa. Dra. Luciana Teresa Dias Cappellini
UNIFESP



Prof. Dr. João Batista da Cruz
FPZSP

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio e incentivo durante todo esse período e a todos que de alguma maneira contribuem para a conservação da biodiversidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais José Carlos Fatoresso e Doralice Tetzner Fatoresso, pelo apoio em todos os sentidos, sem vocês com toda a certeza não estaria concluindo mais esta etapa da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Locosque Ramos, pela oportunidade de aprendizagem, apoio técnico-científico, compreensão, paciência, atenção, pulso e suporte emocional durante todo o período do mestrado. Com toda a certeza cresci profissionalmente e pessoalmente, finalizo essa fase com experiências que levarei por toda a minha vida. Muito obrigada.

À minha colaboradora Irys Hany Lima Gonzalez, por toda ajuda e dedicação tanto na fase experimental, auxiliando nas minhas dificuldades e falta de prática, quanto na escrita da dissertação. Muito obrigada por todo o tempo destinado a mim compartilhando suas experiências, mesmo com todas as importantes tarefas atribuídas a você dentro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

A todos os estagiários, PAPs, funcionários, voluntários, que passaram pelo Departamento de Pesquisas Aplicadas e da FPZSP e me ofereceram auxílio.

A todos os meus amigos e colegas de sala: Adriana, Amanda Mello, Amanda Murcia, Letícia, Marina, Marjory, Paula, Rodrigo e Thiago. Compartilhamos alegrias, tristezas, tensões, experiências e muitos momentos especiais. Sempre guardarei vocês no coração.

À minha prima Natália F. Tetzner pelas dicas, amor e apoio. Ao meu irmão Adriano, cunhada Lariene, sobrinho Emanuel, prima Karina, a todos os meus tios, tias, primo, primas e todos os familiares que de alguma maneira demonstraram carinho.

Aos meus amigos de longa data ou não, próximos atualmente ou mais distantes: Verônica S. de Freitas Blanco (você sempre me inspirou), Felipe Blanco, Bianca Foguel, André Gerotto, Rafael Nava, Rodrigo Anselmo, Rodrigo Teixeira, Viviane Felisberto, Emilly Feitosa, Marília, Consuelo, Mariana Fernandes, Edgar, Laís, Emanuelle Laís, Nicolas e tantos outros. Obrigada pelo apoio, carinho e todos

os momentos que passamos juntos. A minha amiga de trabalho, Mônica Brito, que me apresentou este programa de pós-graduação, me motivou e se tornou uma grande amiga.

Agradeço por fim, a Universidade Federal de São Carlos e a Fundação Parque Zoológico de São Paulo pelo apoio técnico, financeiro e concessão das amostras utilizadas neste estudo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada.

RESUMO

O mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus*, é uma espécie de primata ameaçada de extinção, restrita a fragmentos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo, Brasil. Informações sobre a microbiologia, epidemiologia e transmissão de patógenos são escassas e o objetivo deste estudo foi descrever a diversidade bacteriana da cavidade oral e retal de animais de vida livre (*in situ*) e cativos (*ex situ*). Para identificação dos isolados bacterianos, utilizou-se espectrometria de massa de desorção / ionização por laser assistida por matriz (MALDI-TOF), coloração de Gram e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Um total de 249 isolados bacterianos foram estudados e os resultados demonstraram perfil diferente da diversidade bacteriana entre animais *in situ* e *ex situ*. No total, 19 gêneros bacterianos foram encontrados e os gêneros mais frequentes em animais de cativeiro foram: *Escherichia*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Enterobacter*, e em animais livres foram: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*. De acordo com os dados relatados na literatura, até o momento não foram encontrados relatos de *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Kocuria* sp., *Lysinibacillus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp. em *Leontopithecus chrysopygus*, os quais são relatados neste estudo pela primeira vez. Bactérias com potenciais patogênicos foram encontradas e este trabalho demonstrou a importância da identificação desses microrganismos para futuras práticas de manejo e conservação da espécie.

Palavras-chave: conservação, *Leontopithecus chrysopygus*, patogênico, manejo de animais silvestres, diversidade bacteriana, microbiologia, mico-leão-preto.

ABSTRACT

The black lion tamarin, *Leontopithecus chrysopygus* is an endangered primate species, restricted to fragments of the Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. Information on microbiology, epidemiology and pathogens transmission are scarce and the aim of this study was to describe the bacterial diversity in the oral and rectal cavities of free-ranging (*in situ*) and captive (*ex situ*) animals. For identification of bacterial isolates, we used Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF), Gram stain and Polymerase Chain Reaction (PCR). A total of 249 bacterial isolates were studied and the results revealed a different profile of bacterial diversity between *in situ* and *ex situ* animals. In total, 19 bacteria genera were found and the most frequent genera in captive animals were: *Escherichia*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Enterobacter*, and in free-ranging animals were: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas*. There are no reports in the literature regarding the identification of *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Kocuria* sp., *Lysinibacillus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp. in *Leontopithecus chrysopygus*, which are presented in this study for the first time. Bacteria with pathogenic potential were found and this work demonstrated the importance of identifying these microorganisms for future management and conservation practices.

Keywords: conservation, *Leontopithecus chrysopygus*, pathogenic, wildlife husbandry, bacterial diversity, microbiology, Black Lion Tamarin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição aproximada do gênero *Leontopithecus*, no passado e atualmente. Mapa de Stephen D. Nash/Conservation International. 17
- Figura 2.** Equipamento MALDI-TOF Biotyper- Inserção da placa contendo os isolados bacterianos.....33
- Figura 3.** Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade oral de *Leontopithecus chrysopygus in situ*.....41
- Figura 4.** Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade retal de *Leontopithecus chrysopygus in situ*.....41
- Figura 5.** Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade oral de *Leontopithecus chrysopygus ex situ*.....42
- Figura 6** Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade retal de *Leontopithecus chrysopygus ex situ*.....42
- Figura 7.** Gráfico de frequência dos isolados bacterianos quanto ao comportamento a coloração de Gram de animais em situação *ex situ*.....43
- Figura 8.** Gráfico de frequência dos isolados bacterianos quanto ao comportamento a coloração de Gram de animais em situação *in situ*44
- Figura 9.** Árvore filogenética gerada com base nas sequências da região 16S rRNA de *Staphylococcus* spp. e dos isolados A3I2, A2I2, A2I3, A1I3, A2I1A, A1I4 e A3I1 construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.....46

Figura 10. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p com base nas sequências da região 16S rRNA do gênero *Neisseria* spp. e dos isolados **M1R2** e **M2O2**. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.....47

Figura 11. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p com base nas sequências da região 16S rRNA de *Enterococcus* spp. e do isolado M3R1. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.....48

Figura 12. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p com base nas sequências da região 16S rRNA de *Bacillus* spp. e dos isolados **M4R3**, **A3I5A**, **M2O3** e **M2R1**, Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das identificações bacterianas provenientes de animais em situação <i>ex situ</i>	38
Tabela 2. Resultados das identificações dos isolados bacterianos provenientes de animais <i>in situ</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CECFAU – Centro de Conservação da Fauna Silvestre do Estado de São Paulo
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos
CITES - (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção)
CPRJ – Centro de Primatologia do Rio de Janeiro
FPZSP – Fundação Parque Zoológico de São Paulo
HCCA - matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid
ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICTESP - Instituto Científico e Tecnológico do Estado de São Paulo
IPÊ – Instituto de Pesquisas Ecológicas
IUCN - (União Internacional pela Conservação da Natureza)
LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mL - mililitro
NCBI - National Center for Biotechnology Information
°C – Grau Celsius
RIDOM - Ribossomal Differentiation of Microorganisms
SISBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação
UCs – Unidades de Conservação
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
 μ l – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Gênero <i>Leontopithecus</i>	17
2.2. <i>Leontopithecus chrysopygus</i> e status de conservação.....	18
2.3. Fundação Parque Zoológico de São Paulo e seu papel na conservação da espécie <i>L. chrysopygus</i>	21
2.4. Diversidade e Identificação bacteriana	24
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Amostras, cultivo e isolamento bacteriano	30
4.2. Identificação bacteriana	31
4.2.1. Preparação das cepas controle.....	31
4.2.2. Preparação dos isolados bacterianos.....	31
4.2.3. Preparo da solução matriz.....	32
4.2.4. MALDI-TOF.....	32
4.2.4.1. Calibração do equipamento.....	32
4.2.2.3. Identificação dos isolados.....	32
4.2.4.4. Extração DNA genômico	34
4.3. Amplificação do gene 16S rRNA.....	34
4.4. Reação de Sequenciamento do gene 16S rRNA	34
4.5. Análises filogenéticas.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1. Descrição dos resultados.....	37
5.1.1. Frequência dos gêneros bacterianos	39

5.1.3. Análise Filogenética	45
5.1.3.1. Análises de distâncias	45
5.1.3.2. Árvores Filogenéticas.....	45
A. Gênero <i>Staphylococcus</i>	46
B. Gênero <i>Neisseria</i>	47
C. Gênero <i>Enterococcus</i>	48
D. Gênero <i>Bacillus</i>	48
5.2. Diversidade bacteriana.....	50
5.2.1. Bactérias Gram-positivas e Gram-variáveis.....	50
5.2.2. Bactérias Gram-negativas	55
5.2.3. Considerações gerais sobre a diversidade bacteriana	61
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Os primatas são a ordem de mamíferos com maior número de espécies em risco de extinção no Brasil, estes sofrem principalmente com a exploração inadequada dos recursos naturais pelo homem e alterações em seus habitats naturais (SOUZA-ARAÚJO, 2012). Outros fatores como mudanças em cursos de rios, tráfico de animais silvestres, descarte indevido de resíduos químicos também prejudicam a biodiversidade, elevando os níveis do status de extinção das espécies (SOUZA-ARAÚJO, 2012).

A família *Callitrichidae* é considerada diversa em termos de espécies e subespécies, nela estão inclusos os menores primatas do Novo Mundo, que apresentam massa corporal variando entre 100g a 700g (FLEAGLE, 1999). O gênero *Leontopithecus*, pertencente à família *Callitrichidae*, está representado por quatro espécies: *Leontopithecus rosalia* (Linnaeus, 1766), *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) e *Leontopithecus caissara* (Lorini & Persson, 1990). Essas espécies são endêmicas da Floresta Atlântica Brasileira, que estão nos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Bahia (REIS et al. 2015, REZENDE, 2013).

O mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) é um primata existente no território paulista listado como ameaçado de extinção pela IUCN (União Internacional pela Conservação da Natureza) e CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção), Apêndice I (CITES, 2017; IUCN, 2018). A espécie foi considerada extinta em 1905, sendo que em 1970, no município de Teodoro Sampaio foi redescoberta (SMA, 2015).

O início dos planos de ação para conservação do mico-leão-preto coincide com o momento da sua redescoberta na natureza, em 1970 (REZENDE, 2013). A partir deste fato, esforços para a recuperação de suas populações na natureza começaram a ser realizados desde pesquisas com a espécie, ações de manejo, envolvimento comunitário até as relações interinstitucionais que permitiram a construção e evolução de um Programa de Conservação (REZENDE, 2013).

Com o avanço dos programas de conservação da espécie, o estudo de todo o processo de gestão de população de animais de vida livre e cativeiro tornou-se

fundamental, o conhecimento de patógenos que podem influenciar na saúde humana e animal é importante no conceito de “Saúde Única” e a movimentação desses animais entre ambientes aumenta a possibilidade de introdução de patógenos em novas áreas e entre populações (BUENO, et al., 2015; CUNNINGHAM, 1996).

Há tempos a relação entre saúde animal, humana e ambiental vem sendo discutida por pesquisadores de diversas áreas, visando melhorar o conhecimento e contribuir com a aplicação de soluções quando se trata de doenças infecciosas emergentes, zoonoses, sensibilidade a antibióticos, proteção ambiental e segurança alimentar (FRANK, 2008). É de conhecimento que doenças emergentes apresentam ameaça tanto para a população humana quanto a vida selvagem, este fato representa um preocupante indicador da saúde ecológica destes locais que sofrem com grandes alterações nos seus ecossistemas (D’ELIA & SILVEIRA, 2014). Por este motivo, a ideia de que precisamos considerar o funcionamento dos ecossistemas em sua totalidade, já que animais, vegetais e o homem coabitam um mesmo ambiente e não somente as espécies em si, vem sendo discutida desde o seu surgimento (D’ELIA & SILVEIRA, 2014).

De acordo com dados da literatura, mamíferos possuem uma diversidade microbiana composta principalmente por bactérias, que cobrem toda a superfície da mucosa, mas a maioria desses microrganismos reside no trato gastrointestinal (SOMMER & BACKHED, 2013). Apesar de muitas bactérias gastrointestinais serem hospedeiras comensais, outras são adaptativas por serem centrais em processos fisiológicos fundamentais (HILL, 1997; MACPHERSON & HARRIS, 2004). A microbiota intestinal, sua funcionalidade na ecologia e evolução dos animais é uma área de crescente interesse (MCFALL-NGAI et al., 2013).

As doenças bacterianas podem ocasionar altos índices de morbidade e mortalidade nas populações de primatas (ANDRADE et al., 2010). Alguns tipos de bacterioses são comuns e, achados clínico-bacteriológicos como pneumonia, desordens intestinais e infecções ainda são encontradas em primatas do velho e do novo mundo (ANDRADE et al., 2010).

Uma ferramenta robusta e econômica para identificação microbiana é a espectrometria de massa MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) (ANGELETTI, 2017). O MALDI-TOF, quando comparado com técnicas convencionais de biologia molecular,

é um método rápido, preciso e de baixo custo para a identificação de bactérias, sendo cada vez mais utilizado como a principal ferramenta laboratorial para identificação e diferenciação de gênero e espécie bacterianos (ANGELETTI, 2017; BRUYNE et al., 2011).

As informações sobre a diversidade bacteriana de micos-leões-pretos de vida livre e de cativeiro são escassas, pois esses indivíduos não são de fácil visualização na natureza, além de existirem grupos pequenos em cativeiro, poucos zoológicos mantêm a espécie, tornando restrito o acesso à obtenção de dados. Deste modo à identificação dessa diversidade se faz oportuna e fundamental para estudos de preservação da espécie. No presente trabalho animais em condições *in situ* (vida livre) e *ex situ* (cativeiro) foram amostrados, sendo possível contribuir com informações sobre a diversidade microbiológica presentes nestes animais para futuras ações de manejo e conservação da espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Leontopithecus*

O gênero *Leontopithecus* (Lesson, 1840) é composto por quatro espécies: *Leontopithecus rosalia* (Linnaeus, 1766), *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820), *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) e *Leontopithecus caissara* (Lorini & Persson, 1990) (REIS et al., 2015).

Leontopithecus rosalia (mico-leão-dourado) é endêmica do estado do Rio de Janeiro, *Leontopithecus chrysomelas* (mico-leão-da-cara-dourada) está presente no sudeste da Bahia, *Leontopithecus caissara* (mico-leão-da-cara-preta), espécie endêmica do Paraná e área adjacente do sudeste de São Paulo e *Leontopithecus chrysopygus* (mico-leão-preto), endêmico do estado de São Paulo (Figura 1) (CALDANO, 2014).

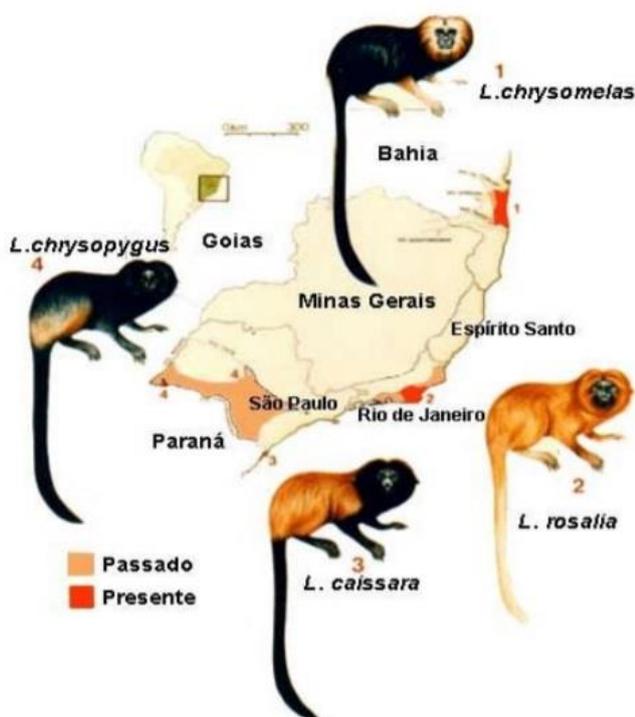


Figura 1. Distribuição aproximada do gênero *Leontopithecus*, no passado e atualmente. Mapa de Stephen D. Nash/Conservation International.

Esses primatas possuem comprimento médio de 27 centímetros, cauda de 39 centímetros e peso aproximadamente de 600 gramas. Formam grupos sociais com

cerca de seis indivíduos e ocupam áreas de vida variáveis, remontando a estimativa populacional. Geralmente são encontrados em florestas primárias, porém podem ser encontradas em áreas de vegetação secundária (PASSOS et al., 2018).

Quanto aos hábitos alimentares é considerado fauni-frugívoro, pois sua dieta é composta por frutos maduros, néctar, exsudatos e pequenos animais, que conseguem manipular devido a uma adaptação de dedos alongados e unhas com formato de garras (VALLADARES-PADUA & MARTINS, 2010). A variedade de itens utilizados pelos *Leontopithecus* na dieta é um indicativo de uma espécie de fácil adaptação a ambientes diversos (VALLADARES-PADUA & MARTINS, 2010). *L. chrysopygus*, o mico-leão-preto, possui pelagem predominantemente negra, exceto a base da cauda e a região lombar, que apresenta coloração castanho-amarelada, sua face é nua, porém com pelagem abundante na cabeça, em forma de juba, o que lhes confere o nome popular e científico (AURICCHIO, 1995; OLIVEIRA, 2016).

2.2. *Leontopithecus chrysopygus* e status de conservação

Considerada uma espécie naturalmente rara, o mico-leão-preto denota baixa densidade populacional dentro de sua área de distribuição e suas características físicas como tamanho, coloração, locomoção rápida e discreta, torna seu encontro no ambiente laborioso (PARANHOS, 2006; REZENDE, 2013).

A espécie foi declarada pelo governo do Estado de São Paulo como Patrimônio Ambiental do Estado em 2014 (SMA, 2015), trazendo benefícios e amparo à espécie, já que todos os órgãos públicos do Estado, em especial, a Secretaria do Meio Ambiente (atual Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente - SIMA) têm desenvolvido esforços à proteção e recuperação da espécie na natureza (SMA, 2015).

A população remanescente de *L. chrysopygus* é de aproximadamente 1400 animais e sua ocorrência *in situ* está condicionada a pequenos fragmentos de Floresta Atlântica, limitada ao norte pelo rio Tietê, a oeste pelo Paraná, pela Serra de Paranapiacaba e Bacia do Paranapanema (KIERULFF & PORT-CARVALHO, 2009; RYLANDS & MITTERMEIER, 2013; SMA, 2015). Há registros na região de Buri e Capão Bonito, onde alguns indivíduos foram estudados no presente trabalho (LIMA et al., 2003), Pilar do Sul (RÖHE et al., 2003) e também no Parque Estadual Carlos Botelho (RODRIGUES, GAGETTI, PIRATELLI; 2014).

Uma potencial ameaça para a espécie é sua distribuição geográfica altamente fragmentada, devido principalmente à destruição continuada dos seus habitats e da redução da população, onde as consequências mais danosas são: (1) isolamento de populações, (2) diminuição do fluxo gênico e (3) possível perda de variabilidade genética (PRIMACK & RODRIGUES, 2008).

A integração de esforços em prol da conservação da espécie obteve excelentes resultados, como a mudança de categoria de ameaça de: “Criticamente ameaçado de extinção” para “Ameaçado de extinção”, além do apoio a criação de unidades de conservação (IPÊ, 2018; MOURA, 2017).

As Unidades de Conservação (UCs) é a denominação dada pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC) para espaços territoriais e seus recursos ambientais, com características naturais relevantes, legalmente instituídos pelo Poder Público, com objetivos de conservação e limites definidos, sob regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção como a Lei 9.985/2000 (ERVIN, 2003). Essas áreas protegidas são fundamentais e importantes instrumentos para a conservação *in situ*, instrumentos de gestão têm como objetivo garantir a sobrevivência dessas áreas e sua real efetividade em consonância com as atividades humanas. Tais instrumentos fortalecem a gestão das áreas protegidas, ordenam o território e compatibilizam a presença da biodiversidade, a valorização da sociobiodiversidade e as práticas de desenvolvimento sustentável (MMA, 2019). O Programa de Conservação do Mico-leão-preto foi a semente para a criação do Instituto de Pesquisas Ecológicas – IPÊ, que atualmente também trabalha com projetos de conservação de outras espécies (IPÊ, 2018; MOURA, 2017).

Este Programa envolve não só a conservação em si dos micos, mas de todo o ecossistema que eles ocupam. O conceito de espécie-bandeira foi utilizado com o intuito de chamar a atenção para a situação atual dos habitats, oportunizando a mensagem conservacionista, trazendo benefícios a toda diversidade biológica envolvida e que poderá ser salva pelo efeito guarda-chuva da espécie-bandeira (IPÊ, 2018; MMA, 2016; OLIVEIRA, 2016).

Estratégias de manejo integrado entre natureza e cativeiro, como reintrodução e translocação podem ser utilizadas (VALLADARES-PADUA & MARTINS, 2010). Em ambas as ações a prioridade da movimentação dos animais é para áreas de sua

ocorrência histórica, e que ainda disponha de recursos requeridos pelas necessidades fisiológicas básicas da espécie (IUCN, 1987).

Obviamente, estudos sobre a viabilidade das práticas de manejo mais adequadas devem ser realizados previamente a sua execução, considerando o monitoramento em longo prazo após a transferência dos animais, pois somente dessa forma torna-se viável a determinação de taxas de adaptação e dispersão, bem como a necessidade de novas solturas e interações, o monitoramento de espécies possibilita a identificação das razões de sucesso ou fracasso do manejo e aprimora cada vez mais os resultados (IUCN, 1987; REZENDE, 2013).

Valladares-Padua et al. (2009), relatam que a natureza e o cativeiro podem e devem ser trabalhados simultaneamente de forma complementar e paralela, proporcionando uma efetiva troca de conhecimentos, visto que a pesquisa em campo aberto pode estabelecer padrões que, possivelmente, podem ser aproveitados para utilização do monitoramento em cativeiro, ao mesmo tempo que a pesquisa em cativeiro consegue alcançar informações de ordem sanitária, de difícil obtenção na natureza, devido a um maior contato com o animal, cujo objetivo central é proporcionar um melhor conhecimento a respeito da espécie, visando o aprimoramento das ações de conservação.

No cenário político brasileiro hoje, diversas medidas adotadas pelo atual governo como: concessão de serviços de uso público, possíveis privatizações de unidades de conservação, medidas provisórias que alteram e enfraquecem as estruturas de órgãos ambientais, aumento na taxa de desmatamento nos primeiros meses de governo, falta de estímulo para as fiscalizações ambientais, entre outros, esbarram em diversas discussões sobre a conservação de espécies ameaçadas e o meio ambiente. Em postagem em uma rede social amplamente utilizada pelo atual Ministro do Meio Ambiente, publicada em março de 2019, após visitar a Floresta Nacional de Capão Bonito (SP), área de ocorrência de *Leontopithecus chrysopygus* conforme já citado anteriormente neste estudo, o mesmo fez a seguinte declaração: **“vamos conceder/arrendar tudo que for possível”** (BOURSCHEIT, 2019; LIMA et al., 2003; CORDEIRO, 2019).

Em 2019 foi iniciado na Floresta Nacional de Capão Bonito, junto aos voluntários do ICMBio, um projeto de mapeamento permanente dos grupos de mico-leão-preto, onde uma das maiores populações da espécie é encontrada no local (CALDANO, 2014). O projeto teve como finalidade facilitar o acesso dos

pesquisadores aos grupos conhecidos na área, buscando atualizar os conhecimentos da equipe da UC, sobre o estado de conservação da espécie, visando saber melhor quais as possíveis ameaças e como atuar para conservá-las (ICMBio, 2019). Este fato reforça a necessidade da conservação dessas áreas protegidas e o incentivo a consolidação de políticas públicas que estejam em consonância com esses princípios.

2.3. Fundação Parque Zoológico de São Paulo e seu papel na conservação da espécie *L. chrysopygus*.

A imagem que se tinha de zoológicos como vitrine de espécies expostas, desvinculada da importância conservacionista das espécies, vem se modificando nas últimas décadas (REZENDE, 2013). A manutenção dos animais em recintos monitorados pode ocorrer por diferentes objetivos e trazer diversas contribuições para a conservação (REZENDE, 2013), inclusive conferindo importância a pesquisas de campo, que fornecem dados fundamentais para o estabelecimento de padrões que possibilitam essa manutenção das espécies em cativeiro (VALLADARES-PADUA et al., 2009).

A Fundação Zoológico de São Paulo, criada em março de 1958, obteve desde a sua lei de criação, a pesquisa científica como uma das funções primordiais. Nos seus primeiros anos de existência, o Zoológico de São Paulo desenvolveu diversos projetos de pesquisa pioneiros em prol da fauna silvestre. Nas últimas décadas ocorreu uma profunda reformulação nos pilares fundamentais da Fundação, tendo em vista o aprimoramento do papel desempenhado pela instituição. Um dos frutos dessa reforma foi a criação da Diretoria Técnica-Científica do Zoológico de São Paulo, que tem como funções principais a consolidação do processo de investigação científica, que fomenta o desenvolvimento científico autônomo da instituição e facilitam o intercâmbio com diversas instituições nacionais e internacionais de pesquisa (DIAS, 2003). Com a evolução dessas ações voltadas à pesquisa, em 2013 o Zoo de São Paulo inaugurou um Complexo Laboratorial direcionado à pesquisa denominado Departamento de Pesquisas Aplicadas e estabeleceu a parceria com a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) para criação do Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna. Ações como essas

mostram o compromisso da Fundação como um Zoológico moderno na conservação da Fauna.

Até agosto de 1990 a Fundação Zoológico de São Paulo e o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) eram as únicas instituições reproduzindo *L. chrysopygus*, quando seis animais foram transferidos para o Jersey Wildlife Preservation Trust (agora DWCT) (KLEIMAN & RYLANDS, 2008). A reprodução no Zoológico de Jersey foi bem sucedida e como consequência, essa população começou a crescer rapidamente (KLEIMAN & RYLANDS, 2008). Desde então, indivíduos da espécie têm sido enviados para outros zoológicos na Europa, América do Norte e Austrália (KLEIMAN & RYLANDS, 2008).

A Fundação Zoológico de São Paulo realiza trabalhos com o mico-leão-preto desde 1986, a fim de manter uma população viável para subsidiar o desenvolvimento de estudos e estratégias de conservação integrada, tanto para animais em cativeiro como para as populações de vida livre, de maneira geneticamente viável, pois se sabe da existência de apenas 55 indivíduos desta espécie cativos em todo o mundo, indicando um número muito reduzido para um programa de conservação em longo prazo (FPZSP, 2018; MOURA, 2017;).

Neste sentido, em parceria com o Sistema Ambiental Paulista, em 2015 foi inaugurado o Centro de Conservação de Fauna Silvestre do Estado de São Paulo (CECFAU), localizado no município de Araçoiaba da Serra (MOURA, 2017).

O CECFAU possui estrutura diferenciada, contando com instalações administrativas, de apoio técnico, alimentação animal, complexo adaptado de recintos para manejo de diferentes espécies e área de treinamentos, deste modo, encontra-se capacitado para cumprir seu objetivo principal: Promover a conservação de espécies da fauna silvestre nativa ameaçada de extinção, por meio de pesquisas e programas integrados de conservação *in situ* e *ex situ* e da manutenção de indivíduos cativos geneticamente viáveis para programas de reintrodução e reforço das populações na natureza (FPZSP, 2018). Em julho de 2015, o CECFAU contava com dez micos-leões-pretos para dar início ao programa integrado de conservação da espécie, já em novembro do mesmo ano, foi comemorado o primeiro nascimento de mico-leão-preto no CECFAU, o filhote é proveniente de uma nova linhagem, consolidando a qualidade genética da espécie em cativeiro (MOURA, 2017).

Além do CECFAU, a Fundação completou em novembro de 2018, 12 anos de certificação ISO 14.001, abrangendo o Parque Zoológico de São Paulo, o Zoo Safári

e a Divisão de Produção Rural em Araçoiaba da Serra - SP. Esta certificação e a sua manutenção por mais de 10 anos mostra que o compromisso da Fundação com a conservação da biodiversidade vai além dos cuidados com a fauna silvestre, abrangendo também os recursos naturais e o controle de impactos negativos que os seres humanos podem causar ao meio ambiente (FPZSP, 2018). Aumentando ainda mais o nível de excelência da Fundação, em agosto de 2018 a instituição obteve sua certificação ISO 9.001 (Qualidade) evidenciando ainda mais seu compromisso com os processos desenvolvidos em um zoológico moderno. Também em 2016, palestrantes renomados abordaram palestras sobre o tema “Microbiologia aliada à conservação da biodiversidade”, onde juntamente com aulas práticas, discutiu-se a importância do estudo da microbiologia em projetos de conservação “*in situ*”, da nutrição e a microbiota normal em animais, dos fatores de virulência e resistência bacteriana, dos diagnósticos de doenças causadas por bactérias anaeróbias e também fungos causadores de doenças em animais (FPZSP, 2016).

Em 02 de outubro de 2017, o CECFAU anunciou o nascimento de mais dois filhotes da espécie, um macho e uma fêmea, onde inicialmente os filhotes receberam apenas os cuidados do grupo familiar, sem intervenção dos técnicos. Atualmente a população da espécie totaliza 14 indivíduos, sendo um indicativo importantíssimo para a instituição, visto que demonstram sucesso de adaptação e manutenção do mico-leão-preto nas instalações do CECFAU, o nascimento de animais considerados em perigo de extinção é de suma grandeza para a conservação da espécie (FPZSP, 2018).

Algumas ações promovidas pela Fundação Zoológico de São Paulo têm como objetivo a educação ambiental e interação da população, apresentando conhecimentos sobre biodiversidade, incentivando de maneira efetiva o respeito aos animais e despertando o interesse pela causa ambiental. Uma das ações abertas ao público, por exemplo, foi a escolha do nome dos filhotes de mico-leão-preto nascidos em outubro de 2017, realizou-se uma enquete online e através das opções sugeridas pelas crianças e jovens participantes do Clube Ecológico da Fazenda do Zoológico, no CECFAU, os nomes foram escolhidos (FPZSP, 2018).

Com o valor da Fundação para as ações de conscientização para conservação de espécies, educação ambiental e pesquisa aplicada, a instituição foi reconhecida em setembro de 2018, pelo Governo do Estado como ICTESP (Instituto

Científico e Tecnológico do Estado de São Paulo), sendo o único Zoológico do Brasil a figurar entre as tradicionais Instituições de Ensino e Pesquisa do País.

2.4. Diversidade e Identificação bacteriana

Todos os seres vivos estão constantemente em contato com microrganismos, inclusive os animais silvestres, tanto no meio ambiente como em seu organismo. Algumas bactérias são de grande importância, visto que, compõem a microbiota natural do animal, auxiliando no funcionamento do organismo. No entanto, à medida que alguns microrganismos se sobrepõem a microbiota normal podem causar alterações intestinais inflamatórias, bem como doenças do trato urinário, vaginites, pneumonias, nefrites, cistites, além de resistência a antibióticos, entre outros (ASPIS et al., 2003; CARVALHO et al., 2014; CHI et al., 2007; GOMES et al., 2011, LILENBAUM, et al., 2006; ZANIOLO et al., 2018). Existe uma variação nas comunidades microbianas de primatas, dependendo do habitat natural, alimentação, idade e ambientes dos indivíduos, sendo variável de espécie para espécie (STUMPF et al., 2016). Essa relação entre hospedeiro e microrganismo é considerada importante para a saúde, especialmente nos casos onde ocorre interação entre cepas comensais e patogênicas (STUMPF et al., 2016).

Dessa forma animais, inclusive selvagens, podem ser considerados potenciais reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos, logo, estudos sobre os eventos de interação entre animais selvagens e de cativeiro com microrganismos podem ampliar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no surgimento de bactérias resistentes, bem como prever o surgimento de novos patógenos (ALLEN et al., 2010; CARVALHO et al., 2014; RADHOUANI et al., 2014).

Estudos sobre a biodiversidade de microrganismos apresentam excepcional interesse científico, pois estes expressam mudanças fenotípicas e genotípicas constantes; e pesquisas sobre a capacidade adaptativa, comportamento e a composição dos microrganismos são essenciais para maiores descobertas relacionadas à saúde pública e animal (GARCIA, 1995; ALMEIDA, 2013).

Os impactos causados pelas ações humanas no meio ambiente ocasionam uma maior disseminação de agentes infecciosos e parasitários entre possíveis hospedeiros, devido a um maior contato entre os homens e os animais, domésticos

e selvagens (BARBOSA et al., 2011). Vários mecanismos ecológicos podem explicar a simultaneidade de diferentes estirpes bacterianas em um mesmo indivíduo (NUNES, 2012), e mesmo com uma literatura exígua sobre as diferenças microbianas relatadas em primatas de vida livre e em cativeiro da mesma espécie, sabe-se que algumas circunstâncias como habitats e comportamentos, geram contrastes entre os dois grupos (CARVALHO et al., 2014).

Os animais silvestres mantidos em cativeiro são continuamente estudados, com intuito de encontrar um manejo que seja considerado ideal e possibilite o dilema de mover indivíduos entre as populações selvagens e de cativeiro (GOMES et al., 2011). Algumas abordagens de manejo populacional resultaram em imunossupressão induzida por estresse como resultado de tais eventos, predispondo os animais a doenças parasitárias e infecciosas (GOMES et al., 2011). O acompanhamento e estudo sanitário dos animais que possivelmente são translocados ou realocados, averiguando quais patógenos podem ser transmitidos a outros indivíduos e ao ambiente, é essencial, pois visa à redução dos impactos causados pela translocação, zelando pela conservação do ambiente e bem-estar animal (DIARD et al., 2010; GRIEKSPoor et al., 2013; MILLER et al., 2014).

Iovine (2016) constatou que a interferência antrópica intensifica a contaminação ambiental com cepas potencialmente patogênicas e/ou que apresenta resistência a antimicrobianos, frisando a necessidade de estudos sanitários durante e após programas de translocação ou realocação de animais selvagens, previamente à sua soltura, para a manutenção da sanidade individual dos animais e também do ambiente onde ocorrerá a liberação. O estudo da microbiota de animais selvagens serve como bioindicador de saúde ambiental.

A espécie estudada neste trabalho, *Leontopithecus chrysopygus*, apresenta literatura escassa referente à diversidade bacteriana, sendo um dos motivos a falta de exemplares da espécie (CARVALHO et al., 2014, LILENBAUM et al., 2006; MORAES et al., 2004). Sendo assim, há necessidade de maiores estudos sobre o assunto, através de diferentes metodologias; para extensão dos conhecimentos referente a espécie e também a fim oferecer subsídios para ações futuras de conservação.

A identificação de uma bactéria pelo seu material genômico demanda cultivo até que se conheça seu código genético, admitindo que a cultura dos isolados é

bastante importante, apesar de haver limitações e dos avanços simultâneos de métodos moleculares (HOLLAND et al., 2003).

A utilização de métodos que possibilitam a manutenção de uma variedade de tipos celulares ou organismos em condições de baixa temperatura é conhecida como criopreservação. Há uma crescente demanda por microrganismos, tecidos e células que esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, tornando a criobiologia uma área de estudo com potencial significativo no desenvolvimento de pesquisas (SOLA et al., 2012). A criopreservação envolve a manutenção de materiais em temperaturas entre -20°C a -80°C em freezers (baixas temperaturas), podendo atingir temperaturas de -150°C a -196°C em containers de nitrogênio líquido (ultra baixas temperaturas). Apesar de eficientes, a estocagem a baixas temperaturas pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, devido a possíveis variações de temperatura nos freezers, já o sistema de armazenamento em nitrogênio líquido, garante temperaturas constantes por longos períodos (DE PAOLI, 2005; SU et al., 1996; WOLFE & BRYANT, 2001).

Por apresentarem uma importante fonte de recursos genéticos com cunho biotecnológico e de desenvolvimento econômico sustentável, os microrganismos contribuem para descoberta de novos fármacos, aplicações na saúde, agricultura, meio ambiente, indústria, entre outros (AGUIAR et al., 2012).

Assim a implantação da criopreservação de microrganismos e a criação de bancos de dados dos mesmos, são estratégias que visam estabelecer um inventário genômico de determinados grupos taxonômicos, geneticamente estáveis e que podem ser utilizados para uma variedade de fins, incluindo pesquisas e processos biomédicos (OLIVEIRA & LANGGUTH, 2006; AGUIAR et al., 2012). Visto que pouco se sabe sobre os exemplares da nossa biodiversidade nativa, a necessidade de iniciativas e estudos relativos a diversidade genética dos microrganismos, se faz fundamental.

Uma ferramenta amplamente utilizada para a classificação fenotípica de bactérias é a coloração Gram, que é um teste rápido, importante e fácil, que permite a diferenciação entre os dois mais importantes grupos de bactérias, dando acesso a um diagnóstico inicial (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009). Em homenagem ao histologista Christian Gram, que desenvolveu essa técnica de coloração diferencial tentando corar bactérias em tecidos infectados, desenvolveu-se um método crucial da microbiologia, que se encontra baseado na capacidade de

algumas bactérias Gram-positivas de reter o complexo cristal violeta-iodo mesmo depois de um tratamento rápido com álcool, já as Gram-negativas não retêm o corante, possibilitando a aplicação posterior de uma contra coloração com outro corante. (REIS & SANTOS, 2016). As bactérias Gram-positivas adquirem cor púrpura, pois o corante fica retido pela camada de peptidoglicano, que é uma estrutura que envolve a célula, enquanto para as bactérias gram-negativas, que possuem a camada de peptidoglicano muito fina e que não retém o cristal violeta, a célula é contra corada pela safranina e se torna vermelha (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009).

A diferenciação entre as bactérias Gram-positivas e negativas resume-se nas características químicas da parede celular. A parede celular de bactérias Gram-positivas apresenta espessa camada de peptidoglicanos e ausência de uma membrana externa, a diferença na constituição da parede celular é à base da coloração de Gram. Estudo como o de Carvalho et al. (2014), indicam pouca diferença da população microbiana entre primatas de vida livre ou cativos, contudo, a frequência de bactérias Gram-positivas se expressou de forma mais efetiva principalmente nas cavidades bucais e nasais. Ao contrário, a cavidade retal revelou uma maior frequência de bactérias Gram-negativas.

Uma técnica que vem sendo efetivamente explorada e apresenta resultados promissores é a espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), que se mostra como um método alternativo confiável para a identificação rápida de bactérias e fungos. Trata-se de uma técnica que, por meio de espectrometria de massa celular completa, obtém a identificação microbiana do isolado cultivado dentro de minutos, em vez das tradicionais caracterizações fenotípicas ou genotípicas. É um novo método desenvolvido para extrair o perfil de proteínas bacterianas de células inteiras de diferentes gêneros e espécies (ANGELETTI, 2017). Esse método de identificação introduzido na taxonomia bacteriana é considerado de alta produtividade, pois tem a capacidade de medir peptídeos e outros compostos mesmo na presença de sais, bem como para análise de misturas complexas de peptídeos, tornando-se um método considerado ideal para medição de extratos não purificados e células bacterianas intactas (BRUYNE et al., 2011).

O MALDI-TOF identifica com sucesso uma ampla gama de bactérias clinicamente relevantes, sendo bastante útil na abordagem dos desafios associados

à identificação desses organismos. Nos últimos anos foi identificada como uma ferramenta confiável de diagnóstico rápido para a identificação da maioria dos microrganismos, várias plataformas e bases de dados foram desenvolvidas, inclusive o Bruker Biotyper (CELANDRONI et al., 2016). O sucesso da técnica para fins de identificação microbiana emergiu como um método rápido de caracterização de bactérias ao nível de gênero, espécie e estirpe, sendo também uma técnica econômica, quando comparada com outras técnicas para a diferenciação de algumas espécies bacterianas (GIEBEL et al., 2010; LAY, 2001). Em estudos como o de Fernández-No et al. (2013), mostra o MALDI-TOF como uma técnica complementar ao sequenciamento 16S rRNA, sendo muito preciso na identificação de estirpes de *Bacillus* de origem alimentar, mostrando-se mais informativa na diferenciação entre espécies, em ambos os níveis de intra e interespecies, quando comparada a análises genéticas inconclusivas. Em Celandroni et al., (2016) também foi comprovada a precisão na identificação de cepas dentro do gênero *Bacillus* e de *Paenibacillus*, quando comparado ao sequenciamento 16S. Técnicas de biologia molecular como o sequenciamento da região 16S rRNA é uma abordagem confiável quando não se tem pistas de identificação de um isolado bacteriano. A região 16S é uma região ribossomal conservada, presente nos procariotos, que conglobera mutações resultantes da evolução das espécies. O sequenciamento dessa região gênica permite a identificação das bactérias ao nível de gênero com 96% de precisão, e na condição de espécie pode alcançar até 87% de confiabilidade, a identificação assertiva de gêneros e espécies de microrganismos é obtida por sequenciamento de DNA (ANGELETTI, 2017; LANGE et al., 2011; SOUZA-POLLO et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2015). Geralmente as sequências obtidas são comparadas com outras sequências já identificadas e depositadas em bancos de dados, onde como, por exemplo, o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o Ribossomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM). Esta técnica é uma abordagem padrão em muitos casos, mas nem sempre é prático para uso rotineiro, devido ao seu custo (BECKER et al., 2004; CELANDRONI et al., 2016).

3. OBJETIVOS

1. Obter informações sobre a diversidade bacteriana das cavidades oral e retal de micos-leões-pretos mantidos na FPZSP e indivíduos de vida livre localizados no município de Buri - SP.

2. Contribuir para o conhecimento dos microrganismos presentes na espécie e colaborar para futuras práticas de manejo e conservação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras, cultivo e isolamento bacteriano

Foram coletadas amostras de suabe oral e retal de micos-leões-preto sem condições de cativeiro (*ex situ*), mantidos na FPZSP (25 indivíduos) e em condições de vida livre (*in situ*), no município de Buri – SP (8 indivíduos). As amostras dos animais *in situ* são originárias de duas saídas de campo, a primeira realizada em novembro de 2012 e a segunda realizada em março de 2013. No total foram amostrados 33 indivíduos.

Todas as coletas e procedimentos foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA N° 4631191018, Anexo 1) e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBio - N° 36839-1 e 65412-1, Anexos 2 e 3).

As amostras foram inoculadas através da técnica de esgotamento por estrias em Ágar sangue de carneiro a 5%, um meio rico e não seletivo para o crescimento das principais bactérias não fastidiosas, em Ágar Mc Conkey, meio seletivo e diferencial para bacilos Gram-negativos e Caldo Selenito Cistina, para o favorecimento do crescimento do gênero *Salmonella* sp. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas e após o crescimento bacteriano foi realizado o isolamento das colônias, com base nas características morfológicas, em meio TSA (Tryptic Soy Agar). Para garantir a qualidade da preservação dos isolados, a caracterização morfológica das colônias foi descrita para posterior validação no momento da reativação dos isolados. Após esse processo as colônias foram inoculadas em 2 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth), incubadas sob agitação orbital a 36° C por 24 horas em uma velocidade de 120 rpm. Após turvação do caldo, 0,5 mL foi adicionado a 0,5 mL de glicerol a 20% e criopreservados em ultra freezer – 80 °C em triplicata. Os isolados bacterianos estão mantidos no banco de Coleções de Culturas de Microrganismos da FPZSP e foram utilizados no presente estudo.

4.2. Identificação bacteriana

Os isolados bacterianos foram identificados utilizando a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight), em colaboração com o Laboratório de Proteômica, da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema (VAN VEEN et al., 2010; LAWTON et al., 2018), conforme descrito a seguir.

4.2.1. Preparação das cepas controle

Para a validação e controle de qualidade das identificações das amostras, foram utilizadas as cepas controle padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As colônias das cepas controle, reativadas em meio TSA, foram depositadas diretamente na placa de leitura do equipamento MALDI-TOF Biotyper e submetidas ao processo de extração de proteínas. Para o procedimento de extração foi inserido 300 µl de água estéril em microtubo de 1,5 mL, adicionando-se uma porção da colônia bacteriana no tubo, 900 µl de etanol e homogeneizando com cuidado. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação na velocidade máxima por 2 minutos e o sobrenadante removido. A etapa de centrifugação foi repetida e o etanol totalmente removido. Foi adicionado 50 µl de ácido fórmico 70% ao precipitado, após a homogeneização, foram adicionados 50 µl de acetonitrila pura e a solução submetida à centrifugação em velocidade máxima por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado à – 20°C até o momento da sua utilização (VAN VEEN et al, 2010).

4.2.2. Preparação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos preservados em triplicata na Coleção de Culturas da FPZSP foram descongelados, inoculados em meio TSA ou Ágar Sangue de carneiro 5% e, incubados por 24 horas à 36°C. Antes da sua utilização para identificação, as colônias bacterianas foram validadas de acordo com as características morfológicas descritas previamente.

4.2.3. Preparo da solução matriz

Para a leitura dos isolados bacterianos no equipamento foi utilizada a solução matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (HCCA) Ultrapura, Sigma-Aldrich®, que foi resuspendida com uma solução orgânica, constituída por 475 μ l de água estéril, 25 μ l de ácido trifluoracético 100% e 500 μ l de acetonitrila 100%.

4.2.4. MALDI-TOF

4.2.4.1. Calibração do equipamento

Para a calibração do equipamento foi utilizada uma cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, uma vez que a mesma já possui seus valores de massas conhecidos. A cepa padrão foi inserida na placa do equipamento diretamente da colônia, aplicando 1 μ L de ácido fórmico 70% e 1 μ L da solução matriz HCCA. Também foi utilizada para a calibração do equipamento a solução extraída deste material biológico, conforme metodologia descrita anteriormente, adicionando 1 μ L da solução e 1 μ l da solução matriz HCCA. Posteriormente, a placa contendo esse material, foi inserida no equipamento e foi utilizado o método MBT_fc para calibração, conforme instruções do fabricante.

4.2.2.3. Identificação dos isolados

Após a reativação dos isolados, conforme descrito no item 4.2.2, depositou-se uma fina camada da colônia bacteriana nos spots da placa do equipamento MALDI-TOF Biotyper (figura 2), em triplicata, sobreposto por 1 μ l de ácido fórmico 70% e 1 μ l da solução matriz HCCA.



Figura 2. Equipamento MALDI-TOF Biotyper - Inserção da placa contendo os isolados bacterianos.

Para a identificação dos isolados foi utilizado o método MBT_standart e a análise dos resultados foi realizada através do software Flex Control (Bruker Daltonics), que gerou os espectros das proteínas dos isolados. Os espectros gerados foram analisados no software Real time Classification (Bruker Daltonics), que foram comparados com o banco de dados Bruker Library, retornando os escores de similaridades. Esses escores variam de 0 a 3, sendo que, para este trabalho e conforme instruções do fabricante, foi considerado somente os valores acima de 1,7. As identificações com escores $\geq 1,7$ foram consideradas como provável gênero e os escores $\geq 2,0$, como provável espécie.

Quando não foi possível a identificação dos isolados bacterianos a partir da metodologia direta da colônia na placa do equipamento, foi realizada uma nova tentativa, utilizando a extração dos isolados, conforme descrito anteriormente.

Os isolados não identificados pela metodologia de MALDI-TOF ou com escores inferiores a 1,7 foram identificados por amplificação e sequenciamento do fragmento gênico de 16S rRNA. Para outros isolados ainda, só foi possível a

categorização quanto o seu comportamento a coloração de Gram. A coloração de Gram foi realizada de acordo com instruções do fabricante New Prov®.

4.2.4.4. Extração DNA genômico

As amostras de indivíduos em condições *in situ* que não foram identificadas através da técnica de MALDI-TOF foram analisadas através do estudo do gene 16S rRNA. Para a extração do DNA genômico das bactérias foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega catálogo número #A1120, seguindo as instruções do fabricante. O DNA Genômico foi quantificado em equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare – USA Spectrophotometer, catálogo nº 28-9569-6).

4.3. Amplificação do gene 16S rRNA

Parte dos isolados bacterianos estudados neste projeto tiveram o gene 16S rRNA amplificados e sequenciados. As reações de amplificação foram realizadas com o uso dos “primers” 27F (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) e 1401R (5´CGGTGTGTACAAGACCC 3´). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo Tris-HCl, pH 8,4 (20 mM) e KCl (50 mM); MgCl₂ (1,5 mM); dNTP´s (200 µM); DNA genômico (30-50 ng); primers (0,3 µM) e *Taq* polimerase (2U). A reação de PCR foi realizada por 30-40 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação de 95°C por 2 minutos; anelamento variando entre 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, catálogo nº 27-9602-01 GE Healthcare, seguindo instruções do fabricante.

4.4. Reação de Sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático, modelo 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems). Os produtos de PCR purificados (5,0 µL) foram adicionados 4,0 µL de *BigDye* v. 3.1

(Applied Biosystems) e 1,0 µL de *primer* para o sequenciamento (0,5 µmol de cada). Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados para amplificação do fragmento: 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), 1401r (5' CGGTGTGTACAAGACCC 3'), além de um terceiro par interno: 782r (5' ACCAGGGTATCTAATCCTGT 3'). O programa de ciclagem para reação de sequenciamento consistiu-se de 25 ciclos a 95°C por 20s, 50°C por 15s e 60 °C durante 60s. Todas as sequências do gene 16S rRNA foram analisadas e comparadas com dados depositados no *GenBank*.

4.5. Análises filogenéticas

As análises foram realizadas utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v. 10.0.5. e os dados brutos das sequências foram capturados, sendo que a análise de qualidade das mesmas, bem como a obtenção das sequências *contigs/consenso* foi realizada utilizando-se o programa *Chromas Pro CurrentVersion* 1:34. Após a obtenção dos *contigs*, os dados foram exportados em formato FASTA. Após alinhamento das sequências utilizando-se o programa *ClustalW* (ALTSCHUL *etal.* 1990), foi realizada a análise filogenética para avaliação de agrupamento das espécies bacterianas encontradas. A partir do alinhamento, foi possível observar a composição nucleotídica e a análise das distâncias entre elas, as quais foram geradas pelo método de *Neighbour-Joining* e modelo de distância *p*. Com base na análise das sequências obtidas, também foram geradas topologias de árvores filogenéticas construídas pelo método de *Neighbour-Joining* com teste de confiança *bootstrap* em 1000 réplicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir de um total de 249 isolados bacterianos mantidos na Coleção de Culturas de Microrganismos da FPZSP, provenientes dos suabes de cavidade oral e retal de animais em condições *in situ* e *ex situ*, 190 isolados foram identificados através da técnica de MALDI-TOF, sendo que 143 destes foram identificados como indicativo de provável espécie e 47 como provável gênero. Outros 16 isolados foram identificados através do estudo do gene 16S rRNA. Um total de 14 isolados mantidos na coleção de amostras da FPZSP não atingiu crescimento bacteriano após sua reativação, portanto não puderam ser identificados, apesar da criopreservação ser um dos métodos mais eficientes de preservação em longo prazo é possível ocorrer danos decorrentes do processo de preservação e perda da viabilidade desses isolados, sendo que as diferenças biológicas dos microrganismos resultam em respostas divergentes ao sistema de congelação e crioprotetores (ABREU & TUTUNJI, 2004). Em 29 isolados bacterianos foi realizada apenas a categorização quanto a coloração de Gram. Esses isolados não puderam ser identificados através da técnica de MALDI-TOF, pois obtiveram escores inferiores a 1,7. No caso de animais em situação *in situ*, esse material também não pôde ser analisado pelo estudo do gene 16S rRNA, devido a qualidade do DNA genômico obtido ou pelo tamanho do fragmento de 16S rRNA obtido, menor do que 800 pares de bases (pb).

Devido ao número de animais amostrados em condições *in situ* e *ex situ* serem diferentes não foi possível realizar uma análise comparativa quanto a diversidade bacteriana encontrada nesses diferentes ambientes, e, para tanto foi realizada uma análise das frequências dos gêneros bacterianos encontrados em cada situação e também ao seu comportamento quanto a coloração de Gram, conforme descrito e discutido nos itens 5.1.1 e 5.1.2.

Em consonância com os objetivos propostos neste estudo, obteve-se informações descritivas a respeito da diversidade bacteriana em cavidades oral e retal de *Leontopithecus chrysopygus*, tanto em animais cativos como animais de vida livre, colaborando para futuras práticas de manejo e conservação da espécie.

Este fato, também reforça a importância e comprometimento da pesquisa científica em locais como Zoológicos, os quais possuem muitas vezes acesso a animais de grande importância conservacionista.

5.1. Descrição dos resultados

Para melhor visualização dos dados, os resultados foram compilados nas tabelas 1 e 2. A tabela geral (sem tratamento dos dados), com identificação de todos os animais presentes no estudo, identificação de cada isolado bacteriano com os resultados e metodologias utilizadas para a identificação encontra-se no Anexo 4 e 5. Os indivíduos em situação *ex situ* (Tabela 1) e *in situ* (Tabela 2) foram categorizados em resultados, tipos amostrais (suabe oral ou retal) e porcentagem dos animais amostrados em relação as bactérias encontradas.

Escherichia coli foi a bactéria encontrada em maior número de animais *ex situ* tanto na cavidade oral como retal. *Bacillus* sp. foi a bactéria encontrada em maior número de animais em *in situ* na cavidade retal, enquanto na cavidade oral foi *Staphylococcus* sp.

Tabela 1. Resultados das identificações bacterianas provenientes de animais em situação *ex situ*.

Tipo de Amostra	Bactéria	Indivíduos com bactéria	% de indivíduos com bactéria
Retal	<i>Bacillus cereus</i>	1	4
	<i>Bacillus sp.</i>	1	4
	<i>Citrobacter youngae</i>	2	8
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	4
	<i>Cronobacter sp.</i>	2	8
	<i>Delftia acidovorans</i>	1	4
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	4
	<i>Enterococcus cecorum</i>	2	8
	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	12
	<i>Enterococcus faecium</i>	2	8
	<i>Enterococcus sp.</i>	1	4
	<i>Escherichia coli</i>	22	88
	<i>Escherichia sp.</i>	2	8
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	4
	<i>Klebsiella sp.</i>	2	8
	<i>Kocuria rhizophila</i>	3	12
	<i>Neisseria perflava</i>	1	4
	<i>Neisseria sp.</i>	1	4
	<i>Proteus mirabilis</i>	7	28
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4
	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1	4
	<i>Raoultella planticola</i>	1	4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4
	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	4
	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	7	28
	<i>Streptococcus sp.</i>	2	8
Oral	<i>Bacillus sp.</i>	2	18
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	27
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	9
	<i>Enterobacter sp.</i>	1	9
	<i>Escherichia coli</i>	8	73
	<i>Escherichia sp.</i>	2	18
	<i>Neisseria macacae</i>	1	9
	<i>Neisseria sp.</i>	7	64
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	9
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	9
	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	9
	<i>Streptococcus sp.</i>	1	9

Tabela 2. Resultados das identificações dos isolados bacterianos provenientes de animais *in situ*.

Tipo de Amostra	Bactéria	Indivíduos com bactéria	% de indivíduos com bactéria
Retal	<i>Bacillus cereus</i>	1	13
	<i>Bacillus mycoides</i>	1	13
	<i>Bacillus</i> sp.	4	50
	<i>Bacillus subtilis</i>	1	13
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	13
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	13
	<i>Enterococcus</i> sp.	2	25
	<i>Lactococcus lactis</i>	1	13
	<i>Lactococcus</i> sp.	1	13
	<i>Lysinibacillus</i> sp.	2	25
	<i>Micrococcus</i> sp.	1	13
	<i>Neisseria</i> sp.	1	13
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	13
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	13
	<i>Staphylococcus</i> sp.	3	38
Oral	<i>Bacillus</i> sp.	2	40
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	20
	<i>Neisseria</i> sp.	1	20
	<i>Paenibacillus</i> sp.	1	20
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	40
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	20
	<i>Staphylococcus</i> sp.	3	60

5.1.1. Frequência dos gêneros bacterianos

Durante o desenvolvimento deste estudo, uma diversidade de 19 gêneros bacterianos foi encontrada, sendo eles descritos a seguir: *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Kocuria* sp., *Lactococcus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Raoultella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.

Para melhor visualização dos resultados obtidos os isolados bacterianos foram categorizados por gênero bacteriano, animais provenientes de ambiente *in situ* ou *ex situ* e amostras de cavidade retal ou oral. Essa categorização gerou gráficos de frequência dos gêneros bacterianos mais comumente encontrados em cada uma das categorias entre os animais amostrados neste estudo.

Em amostras de cavidade oral de *Leontopithecus chrysopygus in situ* (figura 3), pode-se observar maior frequência dos gêneros bacterianos: *Staphylococcus* sp. (33,3%), *Pseudomonas* sp. (22,2%), *Bacillus* sp. (22,2%), *Neisseria* sp. (11,1%) e *Paenibacillus* sp. (11,1%), respectivamente.

Nas amostras de cavidade retal de *Leontopithecus chrysopygus in situ* (figura 4), pode-se observar maior frequência dos gêneros bacterianos: *Bacillus* sp. (31,6%), *Staphylococcus* sp. (21,1%), *Lysinibacillus* sp. (10,5%), *Enterococcus* sp. (10,5%), *Lactococcus* sp. (10,5%), *Micrococcus* sp. (5,3%), *Neisseria* sp. (5,3%), *Enterobacter* sp. (5,3%), respectivamente.

Na figura 5, foi observada maior frequência dos gêneros bacterianos: *Neisseria* sp. (33,3%), *Escherichia* sp. (33,3 %), *Enterobacter* sp. (12,5%), respectivamente. *Bacillus* sp. (8,3%), *Raoultella* sp. (4,2%), *Streptococcus* (4,2%), *Staphylococcus* sp. (4,2%), em amostras de cavidade oral desses animais provenientes de situação *ex situ* (figura 5).

Uma maior frequência respectivamente dos gêneros bacterianos: *Escherichia* sp. (34,9 %), *Streptococcus* sp. (12,7%), *Proteus* sp. (11,1%), *Enterococcus* sp. (7,9%), , *Kocuria* sp. (4,8%), *Klebsiella* sp. (4,8%), *Bacillus* sp. (3,2%), *Citrobacter* sp. (3,2%), *Cronobacter* sp. (3,2%), *Neisseria* sp. (3,2%), *Pseudomonas* sp. (3,2%), *Staphylococcus* sp. (3,2%), *Delftia* sp. (1,6%), *Enterobacter* sp. (1,6%), *Raoultella* sp. (1,6%), foi encontrada em amostras de cavidade retal desses animais provenientes de situação *ex situ*, conforme ilustrado na figura 6.

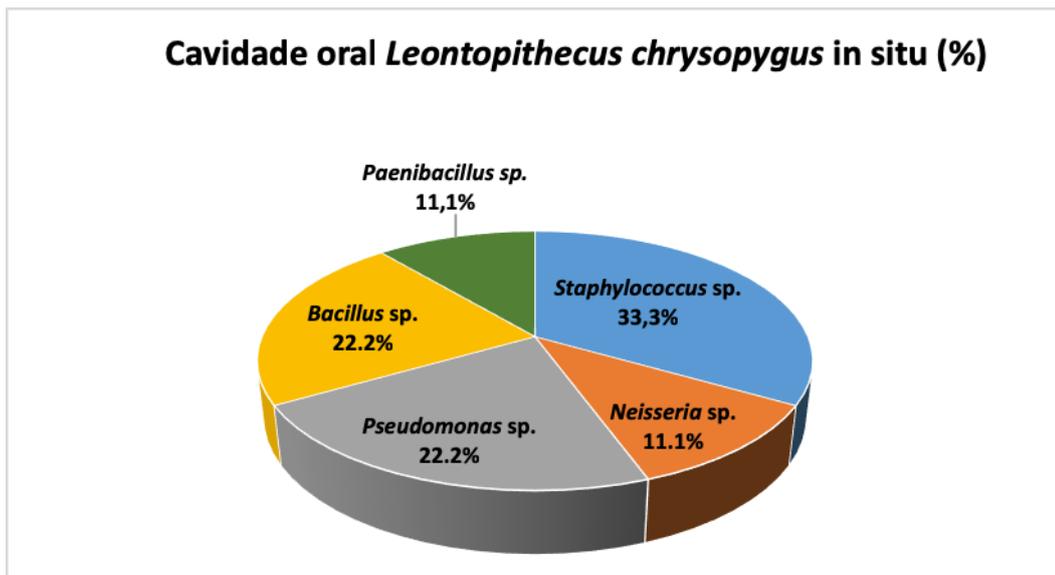


Figura 3. Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade oral de *Leontopithecus chrysopygus* in situ.

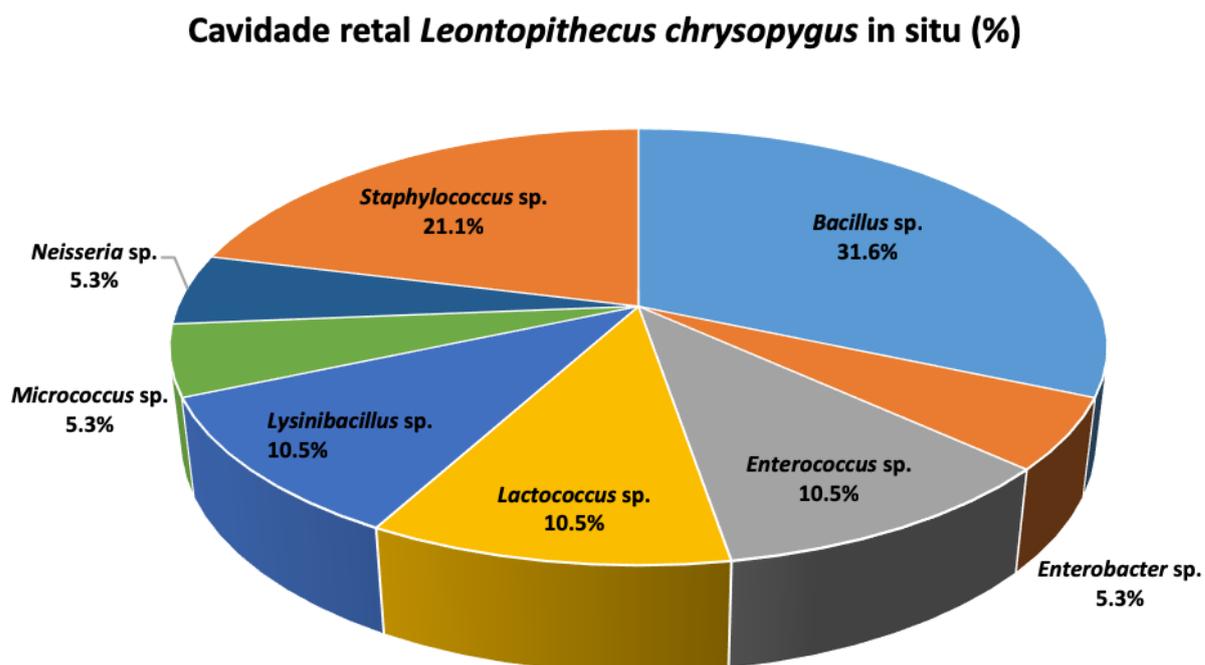


Figura 4. Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade retal de *Leontopithecus chrysopygus* in situ.

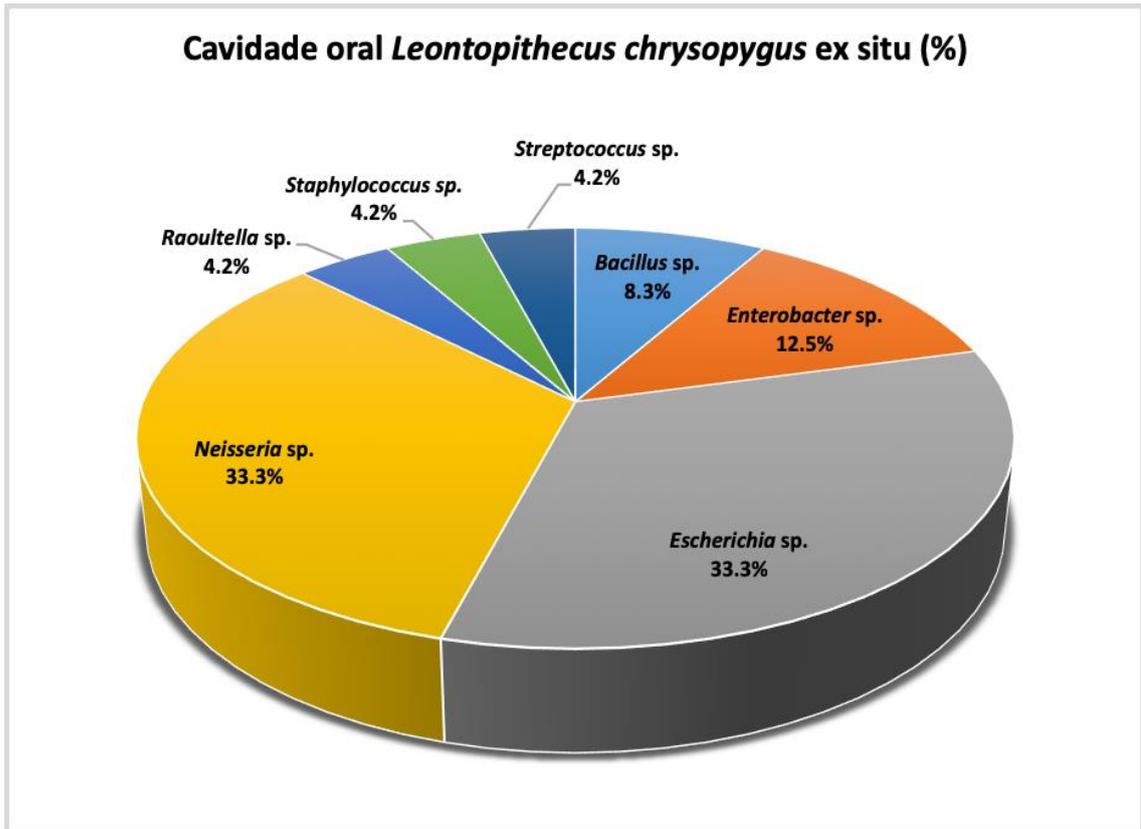


Figura 5. Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade oral de *Leontopithecus chrysopygus* ex situ.

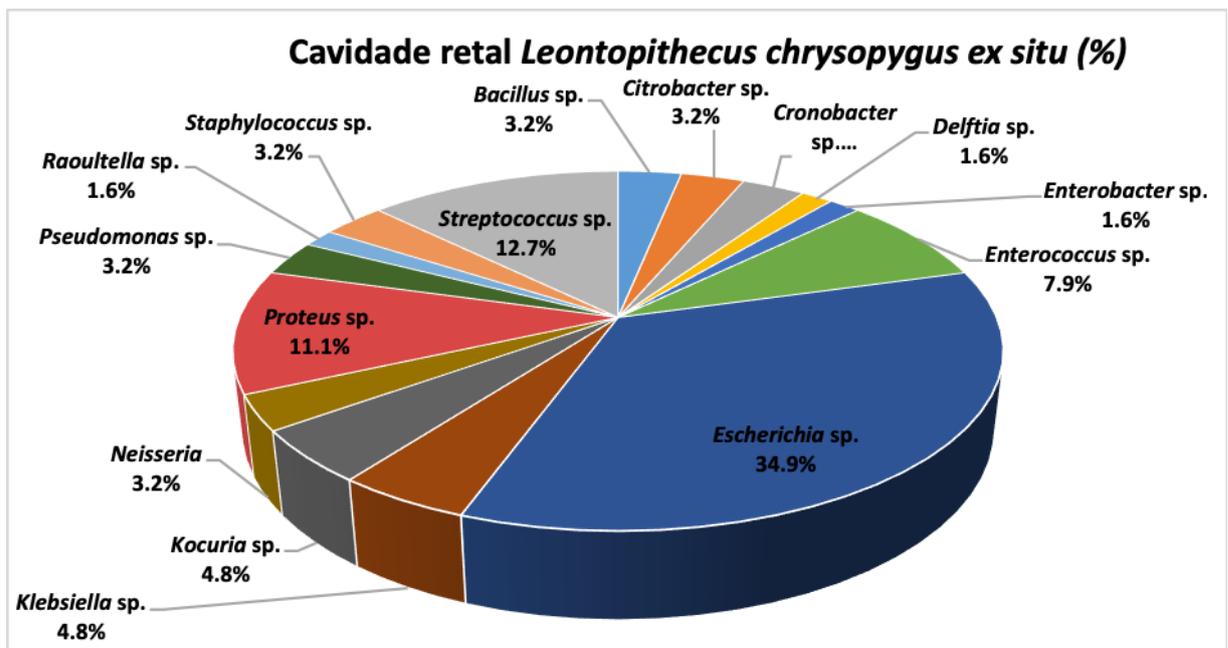


Figura 6. Gráfico de frequência dos gêneros bacterianos encontrados na cavidade retal de *Leontopithecus chrysopygus* ex situ.

5.1.2 Frequência quanto à coloração de GRAM

Todos os gêneros bacterianos descritos, independente da metodologia utilizada, foram categorizados quanto ao seu comportamento a coloração de Gram. Para esta categorização foi utilizada a própria técnica de coloração de Gram ou então consulta no banco de dados do GenBank, gerando assim os gráficos de frequência, conforme figuras 5 e 6, respectivamente, para resultados de amostras de cavidade oral e retal de animais em situação *ex situ* e *in situ*.

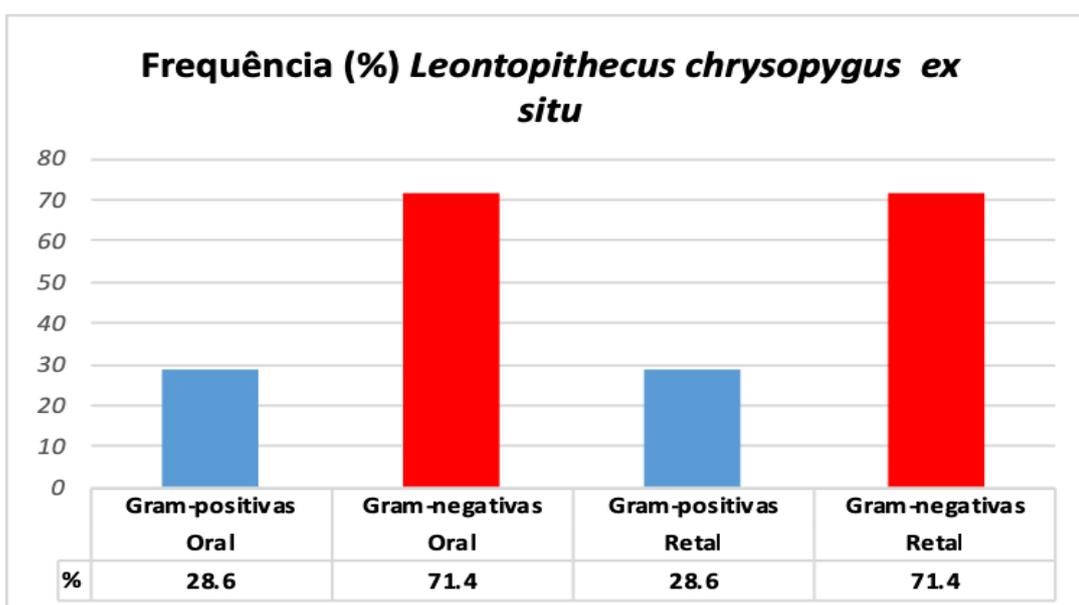


Figura 7. Gráfico de frequência dos isolados bacterianos quanto ao comportamento a coloração de GRAM de animais em situação *ex situ*.

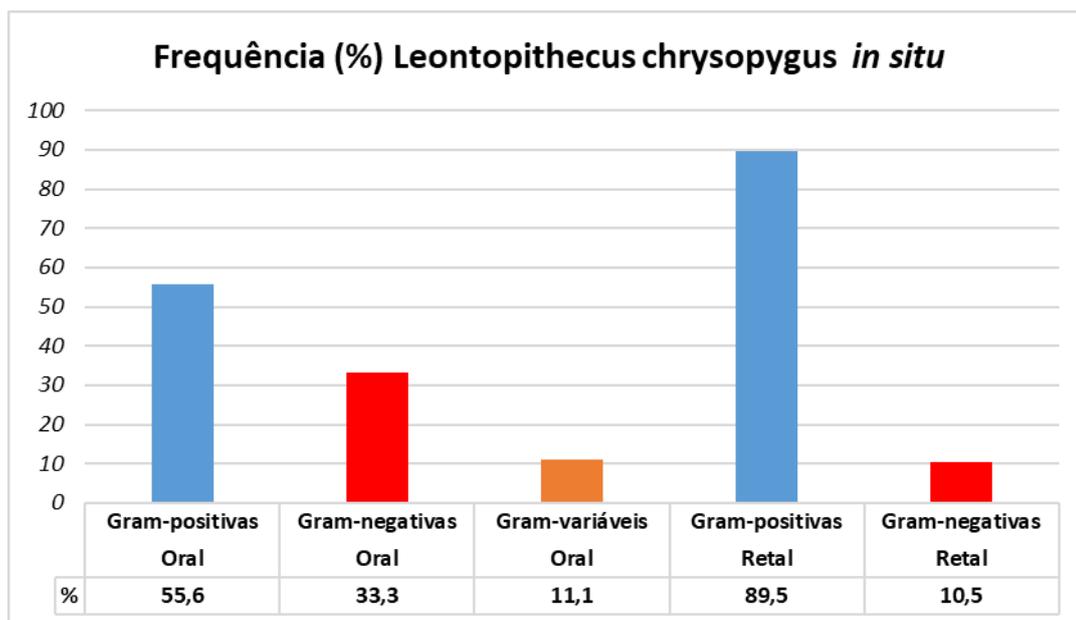


Figura 8. Gráfico de frequência dos isolados bacterianos quanto ao comportamento e coloração de GRAM de animais em situação *in situ*.

De acordo com os gráficos 7 e 8, observou-se maior frequência de bactérias Gram-negativas em indivíduos provenientes de ambiente *ex situ* e, em indivíduos provenientes de condições *in situ* notou-se uma maior frequência de bactérias Gram-positivas. Estes resultados corroboram com dados que relataram diferenças significativas na composição da comunidade microbiana entre animais de vida livre e cativeiro, influenciadas pela dieta, interações com outros animais, habitat e comportamento, pois macacos tem o hábito constante de inserir as mãos possivelmente contaminadas de fezes na boca, por exemplo, transferindo microrganismos entre essas cavidades. (ASPIS et al, 2003; MCKENSIE, et al., 2017; NELSON et al., 2013; WIENEMANN et al., 2011).

Outros estudos ainda sugerem que a diversidade bacteriana de Primatas Não Humanos (PNH) provenientes de cativeiro é alterada, ficando semelhante à encontrada em seres humanos e que o uso de medicamentos também pode ser um fator que influencia nessa mudança (CLAYTON et al., 2016; VLČKOVÁ et al., 2016).

Tanto as bactérias Gram-positivas como as Gram-negativas, são encontradas amplamente no ambiente. As enterobactérias de importância clínica tanto humana, quanto veterinária, são Gram-negativas, podendo ser isoladas em rotinas microbiológicas e em septicemias em humanos e animais silvestres. Ambos os tipos podem ser encontrados em locais onde haja presença de animais silvestres e

domésticos, bem como dejetos humanos ou em qualquer lugar que tenha algum tipo de contaminação fecal, conseguindo sobreviver por longos períodos em solos úmidos, água, fezes, alimentos ou superfícies com matéria orgânica e por isso conseguem se disseminar de diferentes formas. Alguns gêneros de bactérias Gram-negativas encontrados em mico-leão-preto, como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, possuem maior relevância acometendo a saúde animal, já gêneros como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, são bactérias Gram-positivas e promovem infecções secundárias (GOMES et al, 2011; NUNES, 2007)

5.1.3. Análise Filogenética

Os isolados bacterianos de animais em situação *in situ* não identificados pela técnica de MALDI-TOF ou com escores inferiores a 1,7 foram analisados através do estudo do gene ribossomal 16S rRNA, através de sua amplificação, seguidas da reação de sequenciamento, análise das sequências gênicas obtidas no sequenciamento, conforme descrito no item 4.5 e posterior análise filogenética.

5.1.3.1. Análises de distâncias

Por meio da matriz de similaridade utilizando o modelo de distância p , foi possível determinar a distância entre as prováveis espécies pertencente a cada gênero bacteriano encontrado, essas espécies foram consultadas através do LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) e GenBank. (Anexo 6,7,8 e 9).

5.1.3.2. Árvores Filogenéticas

Para a construção das árvores filogenéticas, foram utilizadas sequências de referência de genes 16S rRNA de espécies dos 4 gêneros bacterianos encontrados neste estudo através da análise no sequenciamento, sendo eles: *Bacillus* sp.,

Enterococcus sp., *Neisseria* sp., *Staphylococcus* sp., conforme já detalhado na tabela 2. Utilizou-se a sequência de *E. coli* como membro externo ou *outgroup* para inferir maior distância ao grupo. As sequências foram obtidas através do GenBank e valores com *bootstrap* < 70% foram excluídos da árvore.

A. Gênero *Staphylococcus*

De acordo com a topologia obtida na árvore filogenética encontradas no gênero bacteriano *Staphylococcus* sp. (Figura 9), observou-se 3 agrupamentos (clusters), evidenciando as distâncias entre as espécies do gênero com as amostras desse estudo.

Os isolados bacterianos obtidos neste estudo encontram-se todos no Grupo I, os isolados **A3I2**, **A2I2**, **A2I3** e **A1I3** apresentaram um índice de confiabilidade (*bootstrap*) de 95% entre eles. Os isolados **A2I4A** e *Staphylococcus gallinarum* (D83366), apresentaram confiabilidade de 98%. Já isolados **A1I4** e **A3I1** obtiveram 100% de confiabilidade com *Staphylococcus kloosii* (AB009940).

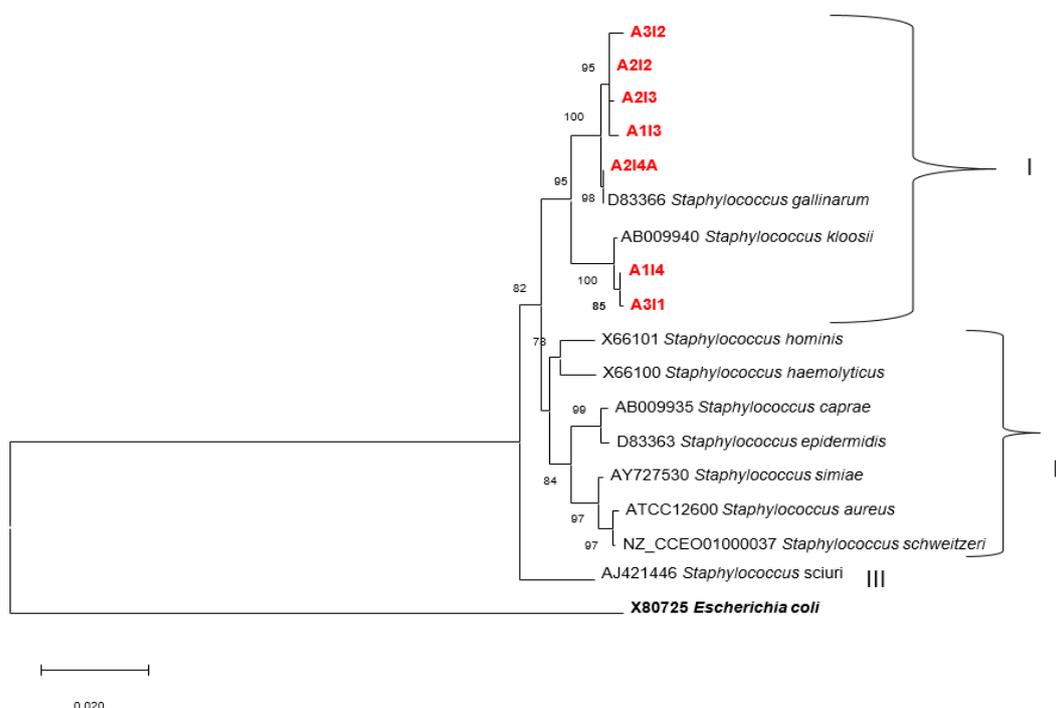


Figura 9. Árvore filogenética gerada com base nas sequências da região 16S rRNA de *Staphylococcus* spp. e dos isolados A3I2, A2I2, A2I3, A1I3, A2I4A, A1I4 e A3I1 construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distância p. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.

B. Gênero *Neisseria*

A árvore filogenética do gene 16S rRNA formada por espécies do gênero *Neisseria* sp. (figura 10), foi composta por 2 agrupamentos (I e II), sendo o agrupamento I subdividido em outros 4 subgrupos. Os isolados bacterianos **M1R2** e **M2O2** obtidos neste estudo estão agrupadas no cluster II e apresentaram um índice de confiabilidade de 100% entre elas, possuindo as mesmas características nucleotídicas. De acordo com o posicionamento desses isolados na árvore filogenética apresentada abaixo, há indicativo de uma possível nova espécie, o que deverá ser melhor explorado através de metodologias complementares.

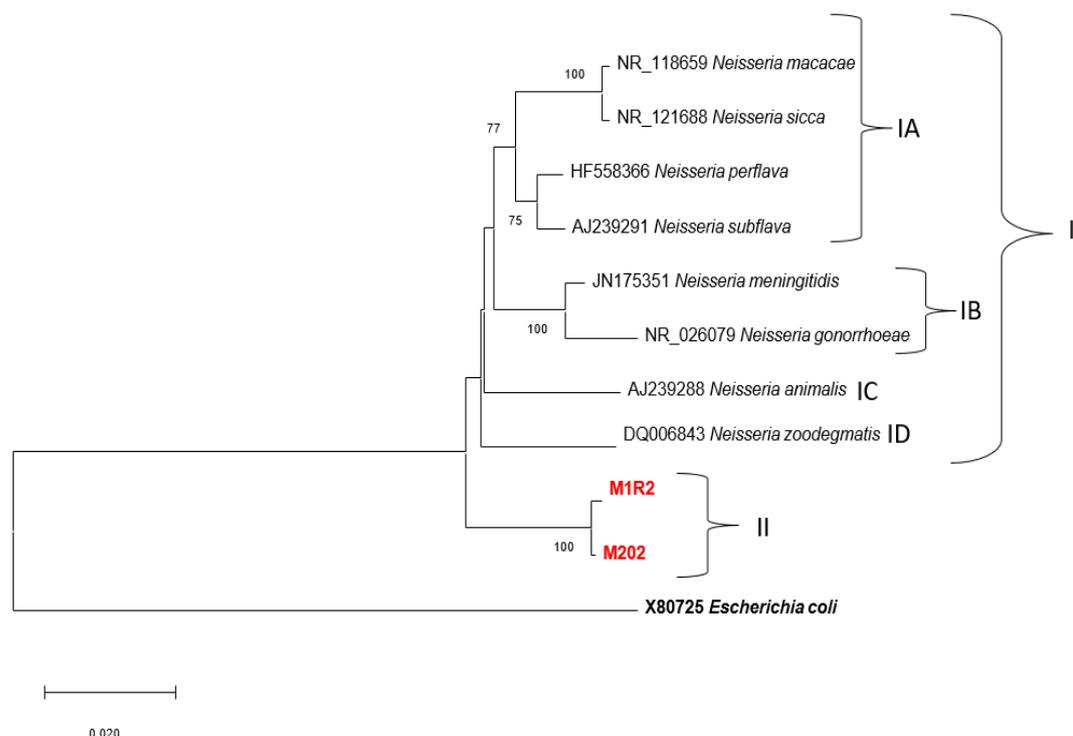


Figura 10. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p com base nas sequências da região 16S rRNA do gênero *Neisseria* spp. e dos isolados **M1R2** e **M2O2**. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.

C. Gênero *Enterococcus*

Observou-se através da topologia da árvore filogenética (figura 11), gerada por meio do gene 16S rRNA de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp., 2 agrupamentos (I e II), sendo que o agrupamento I foi subdividido em IA e IB. O isolado **M3R1**, descrito nesse estudo, está localizado no subgrupo IA e apresentou um índice de confiabilidade de 76% em relação as demais espécies também pertencentes ao mesmo grupo: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus villorum*.

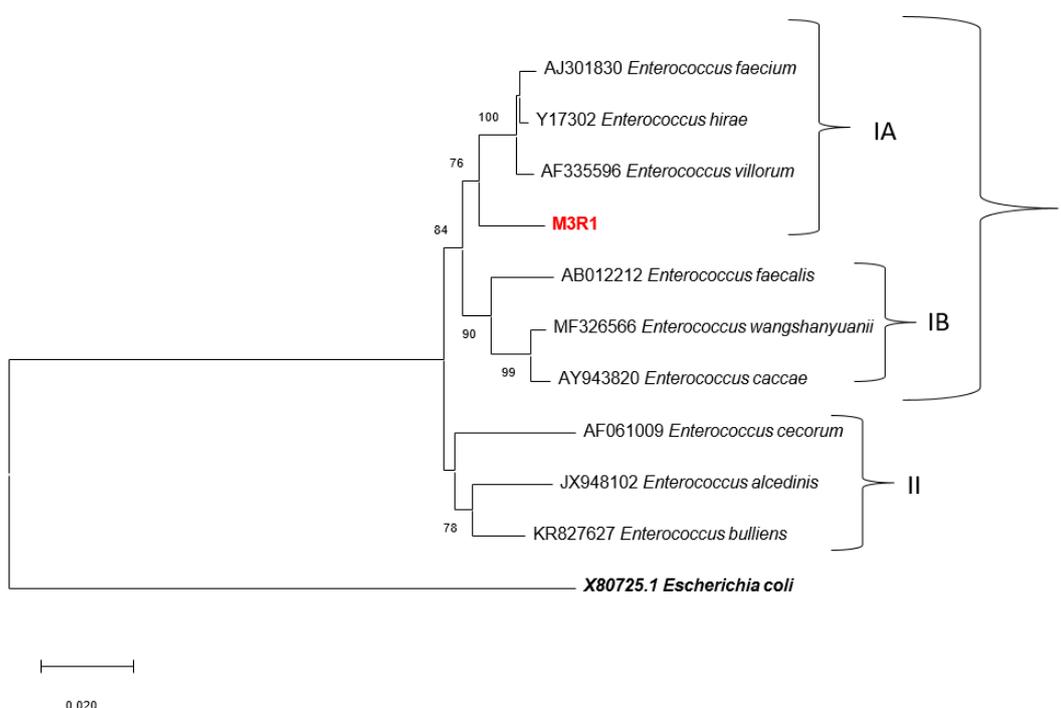


Figura 11. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia p com base nas sequências da região 16S rRNA de *Enterococcus* spp. e do isolado M3R1. Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.

D. Gênero *Bacillus*

Na árvore filogenética gerada para o gênero *Bacillus* sp. (Figura 12), pode-se observar 2 agrupamentos (I e II) subdivididos respectivamente em IA, IB e IIA e IIB. Os microrganismos isolados neste trabalho **A315A**, **M2O3** e **M2R1** foram agrupados no subgrupo IIB, composto também pelas espécies *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus weihenstephanensis* e *Bacillus thuringiensis*. Devido à sua alta homologia genética, os taxonomistas

criaram um único grupo denominado *B. cereus*, que compreende as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* e *B. Weihenstephanensis*. Este grupo compreende bactérias intimamente relacionadas, tais como as quais compreendem estirpes altamente tóxicas e não tóxicas (GUINEBRETIERE et al., 2008; LACERDA, 2018), corroborando assim com os dados obtidos na árvore deste estudo. O isolado **M4R3** foi agrupado no subgrupo IA, o mesmo que as espécies *Bacillus axarquiensis*, *Bacillus malacitensis*, *Bacillus mojaviensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus atrophaeus*, definindo assim a proximidade entre os microrganismos.

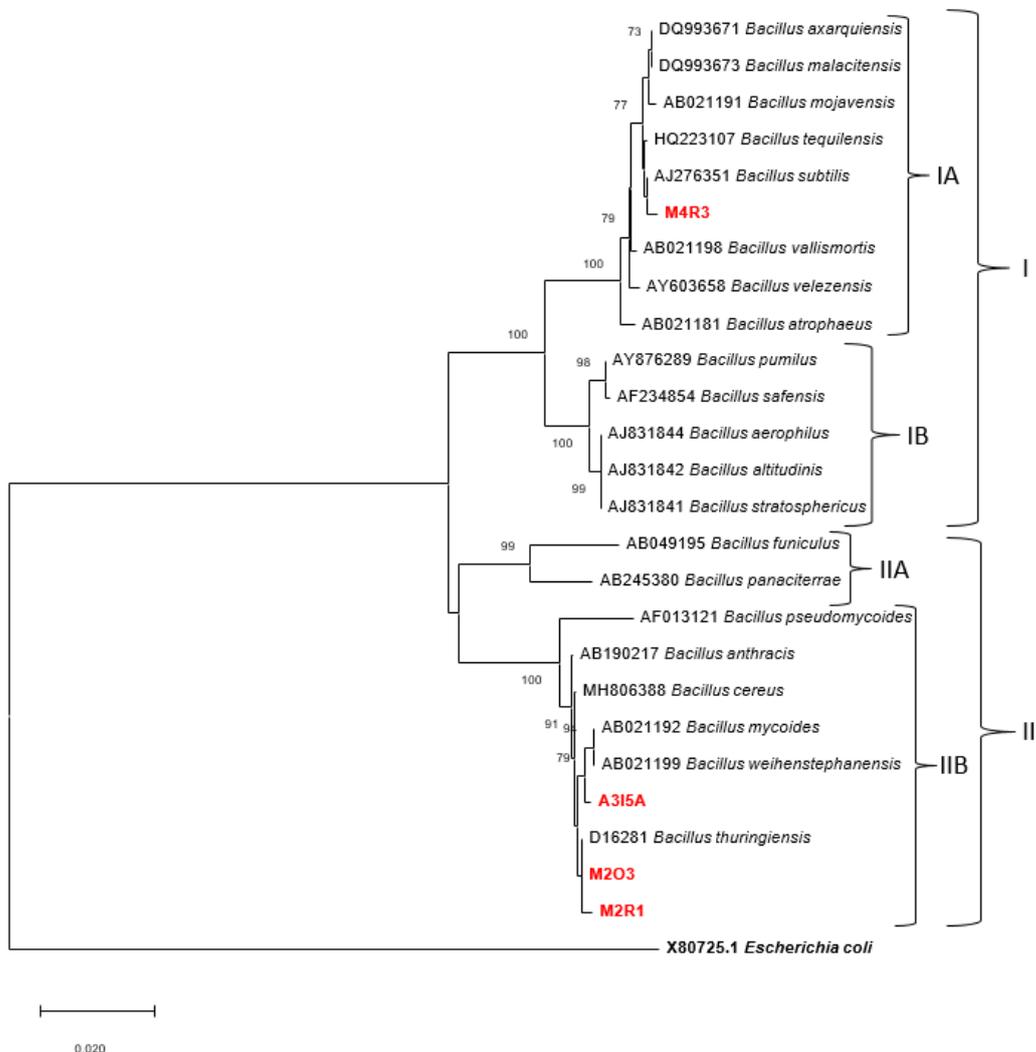


Figura 12. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbour-Joining* e distancia *p* com base nas sequências da região 16S rRNA de *Bacillus* spp. e dos isolados **M4R3**, **A315A**, **M2O3** e **M2R1**, Escala de 0.02 substituições por nucleotídeo. Valores de *bootstrap* expressos com repetições de 1000 réplicas.

A partir das árvores filogenéticas pode-se confirmar a proximidade das características nucleotídicas dos isolados encontrados neste estudo com os gêneros previamente indicados através da análise do sequenciamento gênico. Indicativos de possíveis novas espécies foram encontrados, estes devem ser estudados com metodologias complementares.

5.2. Diversidade bacteriana

5.2.1. Bactérias Gram-positivas e Gram-variáveis

Neste estudo, foram encontrados em indivíduos *ex situ*: *Bacillus cereus* na cavidade retal e *Bacillus* sp. tanto na cavidade oral como retal. Em indivíduos *in situ*, foram encontrados: *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus mycoides* na cavidade retal, e *Bacillus* sp. e *Bacillus thuringiensis* na cavidade oral. O gênero *Bacillus* sp. foi relatado em mico-leão-preto por Carvalho et al. (2014) em ambas as cavidades, corroborando com este estudo, porém não foi encontrado na literatura registros de identificação para prováveis espécies dentro do gênero especificamente em *Leontopithecus chrysopygus*. *Bacillus cereus* é uma espécie comumente isolada de feridas pós-traumáticas e pós-cirúrgicas, sendo que o cateter intravenoso é o responsável pela contaminação causada por espécies desse gênero em humanos (ÅKESSON; HEDSTRÖUM; RIPA, 1991; GURLER et al., 2012). A espécie melhor caracterizada dessas bactérias Gram-positivas é *Bacillus subtilis*, a qual o genoma já foi completamente codificado, pois a mesma é usada de forma recorrente para estudar fenômenos como esporulação e competência para a captação de DNA. Muitos dos genes de *Bacillus subtilis* estão envolvidos na síntese de metabólitos secundários, incluindo antibióticos, que são bastante associados com espécies de *Streptomyces*. (KUNST et al., 1997). *Bacillus thuringiensis*, apesar de compartilhar uma variedade de genes de virulência com outras espécies de *Bacillus* sp., demonstra pouca evidência que indique ou apresente patogenicidade a mamíferos, e os produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* possuem histórico de uso seguro (BERLITZ et al., 2012; CRICKMORE, 2005; FUJIMOTO & KUPPER, 2016, KLEIN et al., 2016).

A ocorrência de *Bacillus* spp. neste estudo pode ser explicada devido a sua versatilidade, sendo espécies aeróbias capazes de produzir estruturas de resistência denominadas esporos. Esses esporos são altamente tolerantes a diferentes tipos de intempéries, e, dessa forma, os representantes deste gênero são capazes de colonizar diversos ambientes (OLIVEIRA et al., 2011), são encontrados em abundância no solo, em água doce, no ambiente hospitalar e na flora gastrointestinal, comuns em pacientes hospitalizados por longos períodos (GURLER et al., 2012). Como ocorrem de forma onipresente na natureza, suas estirpes podem funcionar tanto como probióticos ou como patógenos, produzindo endósporos resistentes ao calor e capazes de produzir biofilmes, podem causar infecções sistêmicas fatais em neonatos, além de doenças severas como meningite, endocardite e osteomielite (GURLER et al., 2012; NAM et al., 2014; STENFORS ARNESEN, et al., 2008; TATARA et al., 2013; WIJMAN et al., 2007). Existe um crescente receio na área de saúde pública sobre a possibilidade desses microrganismos, enquanto comensais, agirem como reservatórios de genes de resistência a antibióticos e também sobre sua capacidade de transferência de genes para células de hospedeiros (LACERDA, 2018; SALYERS, GUPTA & WANG, 2004). Por estes motivos, maiores estudos relacionados ao gênero em espécies animais se tornam importantes, principalmente quando se trata de animais ameaçados de extinção e programas de conservação como neste estudo, problemas relacionados a saúde e a administração de antibióticos podem vir a causar consequências danosas aos indivíduos envolvidos.

Foram relatados neste trabalho em amostras da cavidade retal: *Enterococcus* sp. e *E. faecalis*, em animais *in situ*, e nos indivíduos *ex situ* verificou-se *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. cecorum*, corroborando com o trabalho de Carvalho et al. (2014) que encontrou *Enterococcus* spp. em *Leontopithecus chrysopygus*, o gênero bacteriano não foi encontrado na cavidade oral dos indivíduos amostrados. Existem alguns relatos sobre a presença de *Enterococcus* em diferentes grupos de primatas, como assinalado por Xavier et al. (2010), que reportaram a presença do gênero em amostras fecais de primatas da espécie *Callithrix pennicilata* e *Cebus paella* do Centro de Primatas da Universidade de Brasília, e o mesmo gênero foi encontrado em *Sapajus nigritus* (ZVOBODA, 2017). Avaliou-se a diversidade de espécies, perfis de resistência e virulência, juntamente a variabilidade genética. Glover (2014), trabalhou em dois centros de reabilitação no sul da África, com amostras fecais de

primatas babuínos e *Verver monkeys*, onde identificou o gênero *Enterococcus*, que foram testados frente a antibióticos. Em 2017, Woods et al., utilizando o mesmo gênero bacteriano, a partir de câmaras de registro cefálica crônica de macacos (*Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*), testaram também a resistência antimicrobiana.

Essas bactérias são resistentes e versáteis, com habilidades para resistir a condições adversas como altas concentrações de sal e diferentes temperaturas (10°C a >45°C), por este motivo essa bactéria tem o potencial de se desenvolver em vários ambientes e principalmente solo e água e também em diversas espécies do reino animal, incluindo mamíferos, aves, répteis e insetos (MURRAY, 1990). *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são relatadas como alguns dos principais agentes de infecções hospitalares, paralelamente com o aumento da resistência aos antimicrobianos, presentes no intestino de humanos e animais. As diversas características peculiares de cada espécie contribuem para a adaptabilidade e para a ampla distribuição do gênero na natureza, fazendo com que sejam considerados alvos em potencial para estudos, pois a presença de genes de resistência nas espécies de *Enterococcus* é considerada como alto risco para a saúde humana e animal (LEBRETON et al., 2014; COSTA, 2018). Essas informações corroboram com a presença do gênero nas espécies desse estudo e apresentam um ponto a ser mais bem explorado, principalmente em animais que possuem como finalidade futuros programas de reintrodução e também manejo: animais em condições *ex situ* estão em frequente contato com ambientes antrópicos, este fato é apontado como causa da presença de *Enterococcus* resistentes em primatas não humanos e em animais como cães e gatos, onde há relatos de coabitação dessas cepas multirresistentes a antimicrobianos entre animais e seus donos, o que alerta sobre o risco dessa proximidade (JACKSON et al., 2009; LEITE-MARTINS, 2014; ZVOBODA, 2017).

O gênero *Kocuria* sp., apresenta-se na forma de cocos, sendo gram-positivos, estritamente aeróbicos, não produtores de esporos, são bactérias comensais comuns de pele e orofaringe de mamíferos, encontradas também em outros nichos ecológicos, inclusive aquáticos (PEKALA et al., 2018). Neste estudo foi encontrada a provável espécie *Kocuria rhizophila* na cavidade retal de indivíduos *ex situ*. Importante em aplicações industriais, *K. rhizophila* é comumente usada como cepa padrão de controle de qualidade para testes de suscetibilidade antimicrobiana

(MOISSENET et al., 2012). Não foram encontrados registros de *Kocuria* sp. em *Leontopithecus* spp. até o momento.

O gênero *Micrococcus* sp. foi encontrado apenas em cavidade retal de animais em situação *in situ*, neste estudo. As bactérias desse gênero são gram-positivas e ambientais, conseguindo colonizar de forma transitória a pele do ser humano. Comumente são utilizadas na detecção de compostos antimicrobianos, sendo associada a infecções, abscessos, pneumonia, entre outros (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Este gênero, já foi relatado em outros estudos com *L. chrysopygus* (CARVALHO et al., 2014) e em mucosa oral de macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro (ASPIS, et al., 2003).

A possível espécie *Lactococcus lactis* foi isolada nesse estudo, em encontrada em cavidade retal de animais *in situ*. Esta espécie é tida como um microrganismo modelo, pois seu genoma já foi totalmente sequenciado (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403), e sua manipulação genética é simples, assim inúmeras ferramentas já foram desenvolvidas para essa bactéria, além de apresentar importância econômica (AZEVEDO & MIYOSHI, 2004; BAHEY-EL-DIN et al., 2010; BOLOTIN et al., 2001; DE VOS, 1999). Estudos como o de Carvalho et al. (2014) relataram a ocorrência de isolados de *L. lactis* em *Leontopithecus chrysopygus*.

No presente estudo, *Lysinibacillus* sp. foram encontrados apenas na cavidade retal de animais em condições *in situ*, mas relatos da presença desse microrganismo em *Leontopithecus chrysopygus* são desconhecidos. *Lysinibacillus* sp., são Gram-anaeróbico positivo ou Gram-variável, aeróbio ou facultativo, apresentam forma de bastonetes, sendo células móveis, que produzem endósporos, tolerando extremos ambientais, são ubíquos e também estão presentes em animais (REDA et al., 2018; WENZLER et al., 2015), o que pode justificar a presença do mesmo neste estudo.

Staphylococcus são patógenos importantes para os seres humanos, pois é causador de um espectro amplo de doenças (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009). A espécie mais conhecida e virulenta para humanos desse gênero é *Staphylococcus aureus*, patógeno versátil e eficaz como causador de diferentes tipos de doenças, incluindo intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (MORANDI et al., 2009; PINCHUK et al., 2010). O gênero *Staphylococcus* sp., foi encontrado nos indivíduos em condições *in situ* e *ex situ*, tanto na cavidade oral como na cavidade retal, neste estudo, obtendo uma frequência mais significativa em animais de vida livre. Foram identificadas além do gênero *Staphylococcus* sp. as

prováveis espécies: *Staphylococcus* sp, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciurie*, *Staphylococcus aureus*. Estes microrganismos também podem ser consequência dos hábitos alimentares dos animais, ou podem fazer parte da própria flora microbiana. Aspis et al. (2003), em coletas da cavidade bucal de *Cebus apella* (macaco-prego), foram isolados *Staphylococcus* spp. de 79,3% dos animais, sendo *Staphylococcus aureus* encontrados em 24,1% dos mesmos. Froes et al. (2017), isolou *Staphylococcus hominis* de *Saimiri colinsii* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua – PA. *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, foram isolados da flora vaginal e das cavidades oral, nasal e retal de *Leontopithecus* spp. (CARVALHO et al., 2014; LILENBAUM et. al, 2006), foi isolado *Staphylococcus* sp. em abscesso de *Leontopithecus rosalia* (MCBRIDE & CULLION, 2010). Lilenbaum et al. (2006), isolou *Staphylococcus* spp. a partir de amostras da microflora vaginal de *Leontopithecus* spp. em 100% dos animais amostrados, estes se mostraram resistentes a antibióticos e concluiu que alterações no equilíbrio microbiano destas espécies podem desempenhar um papel importante em infecções no sistema urinário e reprodutivo, esse fato é de suma importância para animais do mesmo gênero como os estudados nesse trabalho que tem um importante papel conservacionista, pois podem trazer dificuldades e impactar nos resultados de possíveis programas de conservação.

Os *Streptococcus* sp., são Gram-positivos e possuem exigências nutricionais complexas (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009). *Streptococcus* sp. e *Streptococcus lutetiensis*, foram encontrados nesse estudo na cavidade oral e retal de animais *ex situ*, corroborando com trabalho de Carvalho et al. (2014), que encontrou o gênero *Leontopithecus chrysopygus*, porém não houve registros da provável espécie *Streptococcus lutetiensis* em *Leontopithecus* spp. até o momento, outros trabalhos também relatam a presença do gênero em primatas não humanos (ANDRADE et al., 2010). Estas bactérias são consideradas parte da microbiota normal da pele e mucosas (trato digestivo, reprodutivo e respiratório), a transição entre bactéria da microbiota normal até agente patogênico, pode depender de fatores predisponentes, como infecções, estresse e imunossupressão (QUEIROZ, 2008), o que ressalta a importância do planejamento em manejos necessários em animais de cativeiro e de vida livre, como por exemplo, o condicionamento e manejo cooperativo, este diminui consideravelmente o stress associado a estes

procedimentos e os riscos para a saúde e bem-estar dos animais envolvidos, porque os próprios animais contribuem para melhorar o seu manejo livre de stress (SPIEZIO et al., 2015).

Paenibacillus sp. compartilham características basais atribuídas ao gênero *Bacillus*, sendo gram-variáveis, anaeróbios facultativos e esporulados, esse gênero compreende espécies relevantes para os seres humanos, animais e plantas, apresentando aplicabilidade na agricultura, medicina, alimentos, rações, detergentes, têxteis, papel e biocombustível (GRADY et al., 2016). Em contrapartida, isolados oportunistas do mesmo gênero podem causar a deterioração de produtos lácteos pasteurizados, ser causador de uma doença letal em abelhas e agirem como infectantes de seres humanos (GRADY et al., 2016). Nesse trabalho encontrado *Paenibacillus* sp. apenas na cavidade oral de *L. chrysopygus* dos indivíduos *in situ*. Na literatura não se encontra relatos, até o momento, do gênero em *Leontopithecus chrysopygus*, sendo assim reportados pela primeira vez no presente estudo, este pode ser um indicativo do contato de animais de vida livre com situações antrópicas, porém maiores estudos devem ser realizados.

5.2.2. Bactérias Gram-negativas

Espécies de *Cronobacter* sp., como a *Cronobacter sakazakii* encontradas neste estudo, na cavidade retal de animais em situação *ex situ*, é um gênero de bactérias gram-negativas, espécies deste gênero foram isoladas de uma grande variedade de alimentos e ingredientes alimentícios (FRIEDEMANN, 2007; HOCHER et al., 2012), tem sido associadas a infecções humanas e são consideradas patógenos oportunistas, causando meningite infantil, sepse e enterocolite necrosante, as taxas de mortalidade em grupos de risco para pacientes infectados está entre 20 – 80% (CRUZ-CÓRDOVA et al., 2012, FAO/WHO, 2008; HUNTER & BEAN, 2013). Recentemente, percebeu-se o alto potencial infeccioso de *Cronobacter* sp. em seres humanos de qualquer idade, a presença da bactéria em diferentes tipos de alimentos é alarmante, pois representam grandes riscos caso sejam consumidos por indivíduos pertencentes a algum grupo de risco (idosos e neonatos) (BRANDÃO et al., 2018). Pesquisas sobre a epidemiologia deste gênero são importantes na identificação de classes de alimentos que podem atuar como

veículos de contaminação e da real prevalência dessas infecções no Brasil (BRANDÃO et al., 2018). Não foi encontrado relato deste gênero na literatura, até o momento, em *Leontopithecus chrysopygus*, sendo estes reportados pela primeira vez neste estudo, a presença do gênero em diversos alimentos pode ser um indicativo da presença do mesmo em cavidade retal de mico-leão-preto em cativeiro nesse estudo, o que deve ser melhor explorado.

Os membros do gênero *Citrobacter* sp. são gram-negativos, se apresentam na forma de bastonetes, o gênero está bastante relacionado com os gêneros *Salmonella* e *Escherichia* (BORENSHTEIN & SCHAUER, 2006; FREDERIKSEN, 2015) e é conhecido como patógeno oportunista, tem ocorrência conhecida como comensal do intestino de humanos e animais, e provavelmente, como consequências de evacuação fecal estão presentes no meio ambiente, podendo ser recuperado de água, esgoto e solo (BRENNER et al., 1999; SEDLAK, 1973). No presente estudo a única espécie encontrada desse gênero foi *Citrobacter youngae*, apenas na cavidade retal de animais em situação *ex situ*. Foram isoladas espécies do gênero *Citrobacter* sp. em *Leontopithecus chrysopygus* e *Leontopithecus rosalia* (CARVALHO et al., 2014; SALES, 2015). Não há relatos especificamente de *C. youngae* em *Leontopithecus spp.*, sendo mais frequentes em humanos.

O principal representante das bactérias da família Enterobacteriaceae certamente é a espécie *Escherichia coli*. Sua morfologia se dá na forma de bastonetes gram-negativos, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, em sua maioria com flagelos peretriqueos, podendo ser encontrada na microbiota entérica de humanos e vários outros animais. Crescem em temperatura de 18 a 44°C, sendo 37°C a temperatura ideal para o seu desenvolvimento (FERREIRA & KNÖBL, 2009; MORAIS, 2014). A espécie é produtora de enterotoxinas de grande importância, sendo uma estirpe enterohemorrágica, e a principal causa de surtos de diarreia, síndromes hemolítica-urêmica e colite hemorrágica em humanos e animais de todo o mundo (KWON & CHO, 2015), dessa forma é então mundialmente zoonótica e grande causadora de infecções alimentares, encontrada em cães, aves silvestres, gado, entre outros animais (HEUVELINK et al., 2002; JAY-RUSSELL et al., 2014).

O gênero *Escherichia* sp. e a espécie *Escherichia coli* foram encontrados em cavidade oral e retal na maioria dos indivíduos *ex situ* amostrados, sua frequência nesses animais foi relevante conforme demonstrada na tabela 1, não houve presença

do gênero em animais em situação *in situ*, corroborando com os trabalhos de Aguiar e Vale (2012), que isolou 41% de *Escherichia coli* em cavidade retal de calaquitrídeos em situação *ex situ*, mantidos no Centro Nacional de Primatas, 100 amostras foram analisadas através do método de sistema automatizado VITEK 2 (bioMeriex); Carvalho et al. (2014), isolou *E. coli* mais comumente encontradas em amostras retais de *Leontopithecus chrysopygus*, essas estavam em 80% dos animais amostrados e Carvalho et al. (2003), estudou primatas não humanos (PHN) neotropicais em zoológicos e criadouros privados, onde encontrou *E. coli* enteropatogênica em 29% dos animais, revelando também relações genéticas dos isolados encontrados nesses animais com bactérias enteropatogênicas em humanos (CARVALHO et al., 2007).

A presença de *E.coli* na boca de animais pode indicar contaminação através dos dejetos na gaiola ou recinto (AGUIAR & VALE, 2012). Dessa forma podemos destacar que problemas relacionados à enterobactérias em animais de cativeiro, podem ser advindos de fatores como os indivíduos viverem em grupo e dividirem espaços em comum, e também às alterações de manejo higiênico e alimentar. À medida que esses microrganismos se sobrepõem à microbiota normal dos indivíduos, podem causar doenças como alterações intestinais de origem inflamatória (GOMES et al., 2011).

Neste estudo foram isolados *Enterobacter* sp. e *Enterobacter cloacae* em amostras na cavidade oral de animais *ex situ*. *Enterobacter ludwigii* foi encontrada tanto em cavidade oral como retal de animais em situação *ex situ*. *Enterobacter aerogenes* foi encontrada na cavidade retal de apenas um indivíduo em situação *in situ*. *Enterobacter* spp. foram relatadas em *Callithrix jacchus* e *Leontopithecus rosalia* nas cavidades oral e retal (SALES, 2015; VERONA, 2008). *Enterobacter aerogenes* é isolado como espécimes clínicos humanos do trato respiratório, urinário, sanguíneo ou gastrointestinal, são considerados bactérias oportunistas e emergiram como patógeno em pacientes de terapia intensiva (DAVIN-RÉGLI & PAGÈS, 2015; LANGLEY et al., 2001; MEZZATESTA et al., 2012), esta espécie foi encontrada em cavidade oral e retal em *Sapajus nigritus* de um parque urbano na região norte do estado do Paraná, Brasil (ZANILOLO et al., 2018). *E. cloacae* se apresenta cosmopolita, tanto em ambientes terrestres como em aquáticos (água, esgoto, solo e alimentos). A espécie ocorre como microflora comensal nos tratos intestinais de humanos e animais e também é patógeno em plantas e insetos. A diversidade de

habitats é reflexo da variedade genética de *E. cloacae* (MEZZATESTA et al., 2012). *Enterobacter cloacae* também foi relatada em abscesso de *Leontopithecus rosalia* cativo (MCBRIDE & CULLION, 2010), na cavidade oral de *Sapajus nigritus* (ZANIOLO et al, 2018) e de *Leontopithecus chrysopygus* do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CARVALHO et al., 2014), corroborando com este estudo.

Klebsiella spp., da família Enterobacteriaceae, pode ser encontrada tanto no meio ambiente, como na superfície mucosa de mamíferos, são bactérias gram-negativas, encapsuladas em forma de bastonetes (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). A espécie mais conhecida do gênero e também encontrada neste estudo é *Klebsiella pneumoniae*, é um patógeno oportunista, causador de graves infecções hospitalares, como pneumonia, septicemia, infecção do trato urinário, e infecção de partes moles em indivíduos debilitados. Esta espécie é bastante conhecida por sua capacidade de transferir determinantes de resistência a fármacos e está ligada a morbidade de primatas não humanos (BUENO, et al., 2015; WO et al., 2015). *K. pneumoniae* foi relatada como a causadora de uma doença sistêmica invasiva em macacos africanos (*Cercopithecus aethiops*), apresentando fenótipos hipermucoviscosos, resultando em abscessos abdominais, pulmonares e/ou cerebrais. (TWENHAFEL et al., 2008). Em macacos *Cynomolgus* e *Rhesus*, foi encontrada uma infecção assintomática e persistente, reconhecida em uma colônia que coabitava com os *C. aethiops* (BURKE et al., 2009).

De acordo com Burke et al. (2009), *Cynomolgus* e *Rhesus* acabam por manter a infecção subclínica no organismo, enquanto portadores, dessa forma algumas instituições optam por manter separados fisicamente espécies de macacos e *Cercopithecus aethiops* (BURKE et al., 2009). Neste estudo foram encontradas colônias de *Klebsiella sp* e *K. pneumoniae* na cavidade retal somente de animais em situação *ex situ*, corroborando com os trabalhos de Carvalho et al. (2014), que encontrou a espécie bacteriana em *Leontopithecus chrysopygus* e Bueno et al. (2015) que descreveu um caso de óbito em *Leontopithecus chrysomelas* por broncopneumonia e bacteremia causada por *Klebsiella pneumoniae*, o animal foi capturado e mantido em quarentena durante um programa para fins de conservação. Estes fatos mostram a importância da triagem microbiológica em animais de cativeiro, como é o caso dos animais amostrados neste estudo, para adoção de posturas que evitem o contato dos indivíduos ao potencial patógeno, geralmente esses animais convivem em grupos e podem transmitir esse patógeno entre si, essa

triagem se mostrou também muito importante para o sucesso de futuros programas de conservação do mico-leão-preto.

Neisseria sp. são bactérias gram-negativas, aeróbias, são consideradas comensais da região nasofaríngea humana, embora alguns ocasionem doenças em pacientes imunocomprometidos, algumas espécies são comuns na superfície de mucosas, podendo colonizar até as mucosas anogenitais (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009; WEYAND et al., 2013). Neste estudo essas bactérias foram encontradas tanto em indivíduos *ex situ*, como *in situ*, nas cavidades oral e retal. Apresentou-se nos animais amostrados as espécies *Neisseria* sp., *Neisseria perflava* e *Neisseria macacae*. Espécies de *Neisseria* já foram identificadas em diversos estudos com macaco-rhesus (*Macaca mulata*), demonstrando menor prevalência nos demais primatas não humanos do que em seres humanos. *N. macacae* foi encontrada como uma nova espécie da orofaringe de rhesus, e está ligada intimamente a comensais humanos, acredita-se que essa ligação se deva as características anatômicas e fisiológicas compartilhadas entre as espécies (LIU et al., 2015). Por conta disso o microbioma nasofaríngeo de *M.mulata*, vem sendo estudado continuamente, sabido seu potencial de animal modelo para alguns patógenos como *Neisseria* sp. (WEYAND et al., 2013). O gênero também foi encontrado em estudo da colonização nasofaríngea em chimpanzés de um santuário da Ilha de Ngamba, onde foi correlacionado com o contato de funcionários do local, dieta e stress, o resultado buscou orientar procedimentos na gestão da rotina do local e usá-lo como base para futuras possibilidades de reintrodução (MUGISHA et al., 2013), este exemplo pode ser usado para outros ambientes que mantem animais cativos e programas vinculados a conservação.

Microrganismos do gênero *Proteus* sp. estão distribuídos de forma ampla no meio ambiente, variando de água poluída, até solo e esterco, onde a espécie consegue desempenhar um papel como decompositora da matéria orgânica de animais e também no trato intestinal de mamíferos. Os bacilos de *Proteus* sp. são recorrentemente associados a pacientes com problemas no trato urinário, eles também podem causar infecções respiratórias em primatas não humanos (ANDRADE et al., 2010; JACOBSEN et al., 2008). Neste estudo foram encontradas amostras de *Proteus mirabilis* na cavidade retal de indivíduos *ex situ*, exclusivamente, a espécie foi relatada em chimpanzés em santuários (MUGISHA et

al., 2013). O gênero também foi relatado em *Leontopithecus chrysopygus* no estudo de Carvalho et al. (2014).

Pseudomonas sp. são bactérias gram-negativas, podem ser patogênicas e ubíquas, usualmente móveis, tipicamente dispostas aos pares, distribuídas nos mais diversos ambientes e muito embora sejam descritos como microrganismos obrigatoriamente aeróbios, podem crescer de forma anaeróbia, utilizando nitrato ou arginina como um aceptor alternativo de elétrons (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER; 2009).

Neste trabalho, espécies de *Pseudomonas* sp. foram encontradas na cavidade retal em indivíduos *ex situ* e, de forma contrária, nos ambientes *in situ*, a espécie foi encontrada na cavidade oral de alguns indivíduos amostrados. *Pseudomonas* spp. foram relatadas em *Saguinus oedipus*, pertencente a mesma família do gênero *Leontopithecus* sp. (LEONG et al., 2004). A espécie *P. aeruginosa*, uma das espécies encontradas nesse estudo, é a mais significativa atualmente devido a sua patogenicidade, pois a mesma está frequentemente associada a diferentes infecções, tanto em humanos como em primatas não humanos (VELA et al., 2006). Outra espécie identificada foi *P. stutzeri*, envolvida em infecções humanas (PUZENAT et al., 2004). Também foi identificada a espécie *P. lundensis*. Em Carvalho et al (2014) foi registrada a presença de *Pseudomonas* apenas em animais cativos, sem definição do potencial de patogenicidade. *P. aeruginosa* e *P. stutzeri* foram encontrados em primatas não humanos, sendo observado em calaquitrídeos e *Leontopithecus chrysopygus*, corroborando com este estudo (AGUIAR & VALE, 2012; CARVALHO et al., 2014; FROES et al., 2017; VELA et al., 2006).

Duas espécies do gênero *Raoultella* foram identificadas nessa pesquisa, ambas encontradas apenas em animais *ex situ*, sendo: *Raoultella ornithinolytica*, encontrada na cavidade oral dos indivíduos, e *Raoultella planticola*, encontrada apenas na cavidade retal, corroborando com o trabalho de Aguiar e Vale (2012), onde o gênero foi isolado de caliquítrídeos, este também foi encontrado em insetos, que por sua vez fazem parte da alimentação do mico-leão-preto, espécie estudada neste estudo (PASSOS, 1999). O gênero *Raoultella*, pertencem a família Enterobacteriaceae, são bacilos aeróbicos gram-negativos, que apresentam patogenicidade similar a *Klebsiella* sp. São organismos ambientais, que raramente causam infecções capazes de acometer os seres humanos (CASTANHEIRA et al., 2009), no entanto, Hajjar et al. (2018), encontram pela primeira vez *Raoultella*

ornithinolytica em paciente saudável que apresentou sintomas de dores abdominais, diarreia e vômitos resultantes de uma apendicite e choque, tanto a *Raoultella ornithinolytica* e *Raoultella planticola* são bactérias produtoras de histamina que são normalmente encontradas em peixes e água (HAJJAR et al., 2018).

Delftia acidovorans, era anteriormente conhecido como *Comamonas acidovorans* ou *Pseudomonas acidovorans*, é um bacilo aeróbico gram-negativo encontrado de forma ubíqua em solo, água, e ambientes hospitalares, podendo ser isolado dos olhos, sangue, e trato respiratório, no entanto raramente é clinicamente significativo, onde as infecções ocasionadas por essa espécie ocorrem mais comumente em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos, também havendo relatos de infecção em pacientes imunocompetentes (BILGIN et al., 2015; CAMARGO et al., 2014; CHUN, et al., 2007; FORBES et al., 2007). Embora não haja relatos específicos em primatas não humanos, *D. acidovorans* é comumente encontrada em animais selvagens (ANDREE et al, 2013; MENDES, 2012). No presente estudo, a espécie foi encontrada apenas na cavidade retal de apenas um indivíduo em condições *ex situ*, o gênero bacteriano foi relatado em mosquitos do gênero *Aedes* sp., como o *Aedes albopictus*, de distribuição global, potencial vetor do vírus da dengue, insetos podem fazer parte da alimentação de *Leontopithecus* spp, conforme descrito anteriormente neste trabalho (KRAEMER et al., 2019).

5.2.3. Considerações gerais sobre a diversidade bacteriana

Informações sobre a diversidade bacteriana das cavidades oral e retal de *Leontopithecus chrysopygus* são escassas na literatura, Moraes et al. (2004) investigou a microbiota vaginal de *Leontopithecus* spp. em cativeiro, buscando identificar seu papel potencial como fonte endógena de infecção. Já em Carvalho et al. (2014), o foco foi a microbiota fúngica e bacteriana potencialmente oportunista nas regiões do nariz, boca e ânus de *Leontopithecus chrysopygus*, onde foram encontrados 203 isolados bacterianos e 84 isolados fúngicos, entre indivíduos de vida livre e cativeiro, bactérias e leveduras foram identificadas bioquimicamente através do uso do API®System (Biomerieux). Ponce-Alonso et al. (2016), revelaram que alguns gêneros bacterianos são muito semelhantes, como por exemplo, os gêneros *Raoultella* sp. e *Klebsiella* sp., encontrados também neste estudo, sendo

impossível distinguir ambos por técnicas bioquímicas convencionais, enquanto o 16S rRNA forneceu resultados inconclusivos, o MALDI-Tof identificou corretamente esses gêneros bacterianos. No presente estudo conforme já descrito anteriormente, utilizou-se como técnicas principais, a espectrometria de massas MALDI-Tof e o estudo do gene 16S rRNA. De acordo com o conhecimento até o momento, não foram encontrados relatos na literatura de *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Kocuria* sp., *Lysinibacillus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp., *Raoultella* sp. especificamente em *Leontopithecus chrysopygus*, sendo estes reportados no presente estudo pela primeira vez, este fato não significa que os achados são peculiares nesses animais, devido a escassez de informações a respeito do assunto. Não houve crescimento de *Salmonella* spp.

Alguns microrganismos encontrados neste estudo, como *Klebsiella pneumoniae* entre outros que foram discutidos anteriormente, podem indicar possíveis riscos a saúde desses animais e o comprometimento de futuros programas de manejo, conservação e até mesmo no monitoramento de animais cativos e de vida livre. Por este motivo, é importante a triagem e estudo desses microrganismos e suas possíveis consequências antes da tomada de qualquer decisão, assim esse trabalho pode auxiliar fornecendo subsídios para tais práticas.

Através da análise dos resultados em relação a categorização das bactérias encontradas em Gram-positivas e Gram-negativas, pode-se verificar um indicativo de perfil diferenciado em animais *in situ* e *ex situ*, sendo que bactérias Gram-positivas são mais frequentes em animais de vida livre e bactérias Gram-negativas são mais frequentes em animais de cativeiro, contudo, maiores estudos e com números amostrais semelhantes são necessários. Essas diferenças constatarem que a ação humana e ambientes antropizados mudam a diversidade bacteriana desses indivíduos e podem intensificar a contaminação ambiental com cepas com potencial patogênico, as quais não se limitam somente a áreas com maiores impactos da ação do homem, porém, estando disseminadas em locais sem a ação direta dos mesmos. Estes fatos, ressaltam a necessidade de estudos sanitários durante todo o processo de programas de soltura/relocação de animais selvagens, conforme relatado por IOVINE (2016), em estudo realizado com *Leontopithecus chrysomelas* durante um programa de translocação no Brasil.

Este estudo demonstrou a importância da participação e engajamento de lugares como zoológicos e programas de pós-graduações em instituições de ensino com a pesquisa científica, esses locais possuem muitas vezes acesso a animais ameaçados de extinção e de grande importância conservacionista e também ressalta a importância em manter cada vez mais áreas protegidas, como Unidades de conservação (UCs), pois fatores antrópicos podem interferir na saúde ambiental dos ecossistemas como um todo. Políticas públicas para conservação do Meio Ambiente devem ser pensadas com auxílio de profissionais que atuam na área como: Zoológicos e formados por Programas de Pós-Graduação, como o Programa em Conservação da Fauna, que são profissionais formados na prática com o objetivo da Conservação.

6. CONCLUSÕES

1. Foram encontrados 19 gêneros bacterianos durante o desenvolvimento deste estudo, sendo eles: *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Kocuria* sp., *Lactococcus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Raoultella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.
2. *Cronobacter* sp., *Delftia* sp., *Kocuria* sp., *Lysinibacillus* sp., *Neisseria* sp., *Paenibacillus* sp., foram relatados pela primeira vez neste estudo, segundo os dados de literatura, em amostras de *Leontopithecus chrysopygus*.
3. De acordo com os resultados de variedade de gêneros bacterianos obtidos neste estudo, há evidência das diferenças dos microrganismos mais encontrados em animais de vida livre (*in situ*) e animais de cativeiro (*ex situ*).
4. Novos estudos, com aumento do número amostral e igualitários, são necessários para comparação dos mesmos e fortalecimento dos resultados.
5. Este estudo ampliou o conhecimento sobre a diversidade bacteriana em *Leontopithecus chrysopygus*, subsidiando futuros estudos e ações para conservação da espécie.

6. Bactérias com potencial patogênico foram encontradas, demonstrando a importância da identificação desses microrganismos para futuras práticas de manejo e conservação.
7. As amostras deste estudo são provenientes de uma coleção de cultura de microrganismos mantida na Fundação Zoológico de São Paulo, reforçando a importância dos Biobancos para estudos científicos nas mais variadas áreas, seja saúde animal, humana, biotecnologia, meio ambiente, entre outras.
8. Este estudo reforça a importância e comprometimento com a pesquisa científica em locais como Zoológicos e também da participação de profissionais que atuam na área nas políticas públicas para a conservação da fauna e do meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. D. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R.; BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; COSTA, E. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró/RN, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.

AGUIAR, D. C. F, VALE, M. C. B. Avaliação da microbiota da cavidade oral e anal em famílias de primatas calitriquídeos mantidos em cativeiro. Livro de Resumos do **XXIII Seminário de Iniciação Científica da UFPA**. 2012.

AKESSON, A.; HEDSTROUM, S. A.; RIPA, T. *Bacillus cereus*: A significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds on orthopaedic wards. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 71-77, 1991.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 251-259, 2010.

ALMEIDA, A. M. S. Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência. 2013. Disciplina de Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás Nível: Mestrado.

ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FERREIRA FILHO, J. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 223, 2010.

ANDREE, K. B.; RODGERS, C. J.; FURONES, D.; GISBERT, E. Co-Infection with *Pseudomonas anguilliseptica* and *Delftia acidovorans* in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.): a case history on an illegally trafficked protected species. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 647-656, 2013.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

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

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995.

AZEVEDO, V. E MIYOSHI, A. Novas utilizações Biotecnológicas e terapêuticas das Bactérias do Ácido Lático, cap. 40 (p. 801-818) In **Genômica**. São Paulo: Editora Atheneu. p.1114. 2004.

BAHEY-EL-DIN M.; GAHAN C.G.; GRIFFIN B.T. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. **Curr Gene Ther** , v. 10, n. 1, p. 34-45, 2010.

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 14, p. 1-9, 2011.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P., PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequência database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

BERLITZ, D. L.; GIOVENARDI, M.; CHARLES, J. F.; FIUZA, L. M. Toxicity intraperitoneal and intragastric route of *Bacillus thuringiensis* and *Melia azedarach* in mice. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 511-517, 2012.

BILGIN, H.; SARMIS, A.; TIGEN, E.; SOYLETIR, G.; MULAZIMOGLU, L. *Delftia acidovorans*: a rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 277-279, 2015.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBAACH, J.; EHRlich, S.D.; SOROKIN, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Res** v. 11, p. 731–753, 2001.

BORENSHTEIN, D.; SCHAUER, D. B. The Genus *Citrobacter*. **The Prokaryotes**, p. 90–98, 2006.

BOURSCHEIT, A. *Desmonte de políticas ambientais é a marca de 100 dias de governo Bolsonaro*. **OECO**. 2019. Disponível em: <<https://www.oeco.org.br/reportagens/desmonte-de-politicas-ambientais-e-a-marca-dos-100-dias-de-governo-bolsonaro/>>. Acesso em: 24 abril 2019.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; FILIPPIS, I. *Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S198167232018000100301&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 30 abril 2019.

BRENNER, D. J.; O'HARA, C. M.; GRIMONT, P. A.; JANDA, J. M.; FALSSEN, E.; ALDOVA, E.; AGERON, E.; SCHINDLER, J.; ABBOTT, S. L.; STEIGERWALT, A. G. (1999): Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2619–2624, 1999.

BRUYNE, K.; SLABBINCK, B.; WAEGEMAN, W.; VAUTERIN, P.; DE BAETS, B.; VANDAMME, P. L. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra

through data analysis and machine learning. **Systematic and applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 20-29, 2011.

BUENO, M. G.; IOVINE, R. O.; TORRES, L. N.; CATÃO-DIAS, J. L.; PISSINATTI, A.; KIERULFF, M. C. M., & CARVALHO, V. M. Pneumonia and bacteremia in a golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) caused by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* during a translocation program of free-ranging animals in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 3, p. 387–391, 2015.

BURKE, R. L.; WHITEHOUSE, C. A.; TAYLOR, J. K.; SELBY E. B. Epidemiology of invasive *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscosity phenotype in a research colony of nonhuman primates. **Comparative medicine**, v. 59, n. 6, p. 589-597, 2009.

CALDANO, L. T. P. **Censo populacional e avaliação da variabilidade genética das populações de mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta Nacional de Capão Bonito - SP.** 2014, 62 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

CAMARGO, C. H.; FERREIRA, A. M.; JAYARONI, E.; REIS, B. A.; BUENO, M. F.; FRANCISCO, G. R.; GALLO, J. F.; GARCIA D. O. Microbiological characterization of *Delftia acidovorans* clinical isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 4, p. 330-333, 2014.

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

CARVALHO, V. M.; IRINO, K.; ONUMA, D.; CASTRO, A. F. P. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 40, p.237-241, 2007.

CARVALHO, V. M.; VANSTREELS, R. E.; PAULA, C. D.; KOLESNIKOVAS, C. K.; RAMOS, M. C. C.; COUTINHO, S. D., MARTINS, C. S.; PISSINATTI, A.; CATÃO-DIAS, J. L. Nasal, oral and rectal microbiota of Black lion tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*). **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 1531-1539, 2014.

CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L. M.; DIPERSIO, J. R.; KANG, J.; WEINSTEIN, M. P.; JONES, R. N. First Descriptions of blaKPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4129–4130, 2009.

CELANDRONI F.; SALVETTI, S.; GUEYE, S. A; MAZZANTINI, D., LUPETTI, A., SENESI, S.; GHELARDI, E. Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-13, 2016.

CHI, F.; LEIDER, M.; LEENDERTZ, F.; BERGMANN, C.; CHRISTOPHE, B.; SCHENK, S.; PAULI, G.; ELLERBROK, H.; HAKENBECK, R. New *Streptococcus pneumoniae* clones in deceased wild chimpanzees. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n.16, p. 6085-6088, 2007.

CHUN, J.; KIM, B. K.; LIM, Y. W.; KIM, M.; KIM, S.; LEE, J. H.; JUNG, Y. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2259–2261, 2007.

CITES - CONVENÇÃO SOBRE COMÉRCIO INTERNACIONAL DAS ESPÉCIES DA FLORA E FAUNA SELVAGENS EM PERIGO DE EXTINÇÃO. **Apêndices I, II y III**. 2017. Disponível em: <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2017/S-Appendices-2017-10-04.pdf>. Acesso em: 24 de novembro de 2018.

CLAYTON, J. B.; et al. Captivity humanizes the primate microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, n.37, p. 10376-10381, 2016.

CORDEIRO, E. A. F. Itatiaia assina contrato de concessão nessa quarta. **MMA**. 2019. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/informma/item/15394-itatiaia-assina-contrato-de-concess%C3%A3o-nesta-quarta.html>. Acesso em: 02 de abril 2019.

COSTA, L. F. X. **Caracterização de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de fezes de morcegos *Tadarida brasiliensis***. 2018, 99 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 347–350, 2005.

CRUZ-CÓRDOVA, A.; et al. Flagella from Five Cronobacter Species Induce Pro-Inflammatory Cytokines in Macrophage Derivatives from Human Monocytes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

CUNNINGHAM, A. A. Disease risks of wildlife translocations. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 349–353, 1996.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 392, 2015.

DE PAOLI, P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 897–910, 2005.

DE VOS, W.M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**; v. 2, p. 289-295, 1999

D'ELIA, M. L.; SILVEIRA, J. A. G. Medicina da Conservação: a ciência da saúde e do ecossistema - A desafiante interface que integra as saúdes humana, animal e

ambiental e a crescente demanda de pesquisadores atuantes no Brasil. **Cadernos Técnicos De Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 72, n. 1, p. 18-29, 2014.

DIAS, J. L. C. Zoológicos e a pesquisa científica. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n 1/2, p. 127-128, 2003.

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

ERVIN. J. Protected areas assessments in perspective. **BioScience**, v. 53, n. 9, p.819-822, 2003.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. **Microbiological Risk Assessment Series**, n. 15, p. 84, 2008.

FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K.; DIAZ-BAO, H.; CEPEDA, U.; BARROS-VELAZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Food microbiology**, v. 33, n. 2, p. 235-242, 2013.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**, 2ª edição, Ed. FACTA, Campinas, p. 457-474, 2009.

FLEAGLE, J. G. **Primate Adaptation and Evolution**. Elsevier Academic, Edição 2, p. 596, 1999.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. **Microbiologia de Diagnóstico de Bailey & Scott**. Ed.12. São Luís: Elsevier. Comamonas e organismos semelhantes, p. 363–370, 2007.

FRANK, D. One world, one health, one medicine. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 1063–1065, 2008.

FREDERIKSEN, W. Citrobacter. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-23, 2015.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2007.

FROES, D. A.; et al. Estudo da microbiota bacteriana (oral e retal) e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos na espécie *Saimiri colinsii* criados em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua-PA. **Caderno de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Primatologia**. 2017. Pirenópolis – GO. Sociedade Brasileira de Primatologia, p. 211-212, 2017.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO). “Microbiologia Aliada à conservação da biodiversidade”. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/noticias/microbiologia-aliada-a-conservacao-da-biodiversidade/>. Acesso em: 15 de dezembro de 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) “Fundação Parque Zoológico de São Paulo 2015-2018”. Disponível em: <https://smastr16.blob.core.windows.net/home/2018/12/10-fundacao-parque-zoologico-de-sao-paulo-2015-2018.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro 2018

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “A HISTORIA DA FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO” – 2018 – Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/a-fundacao/historia/>. Acesso em: 15 dezembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “CECFAU” – 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/conservacao/cecfau/>. Acesso em: 21 de novembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) -“ “VAMOS BATIZAR OS FILHOTES DE MICO-LEAO-PRETO? ” – 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/noticias/vamos-batizar-os-filhotes-de-mico-leao-preto/>. Acesso em: 07 de novembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “ZOO É RECONHECIDO COMO INSTITUIÇÃO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA” 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/noticias/zoo-e-reconhecido-como-instituicao-de-ciencia-e-tecnologia/>. Acesso em: 14 de setembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO CONSEGUIE O SELO ISO 9.001 E A RECERTIFICAÇÃO ISO 14001” – 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/noticias/fundacao-parque-zoologico-de-sao-paulo-consegue-o-selo-iso-9-001-e-a-recertificacao-iso-14001/>. Acesso em: 18 de novembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “PESQUISA E CONSERVAÇÃO” – 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/conservacao/>. Acesso em: 05 de dezembro 2018.

FPZSP (FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO) - “CONSERVAÇÃO IN SITU” – 2018. Disponível em: <http://www.zoologico.com.br/conservacao/conservacao-in-situ/>. Acesso em: 05 de dezembro 2018.

FUJIMOTO, A.; KUPPER, K. C. Production of Antifungal Compounds and Hydrolytic Enzymes by *Bacillus* spp. As Mechanisms of Action against *Phyllosticta citricarpa*. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 9, p. 19-27, 2016.

GARCIA, E. S. Biodiversity biotechnology and health. **Cadernos de saúde publica**, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GIEBEL, R.; WORDEN, C.; RUST, S. M.; KLEINHEINZ, G. T.; ROBBINS, M.; SANDRIN, T. R. Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). **Advances in Applied Microbiology**, v. 71, p. 149–184, 2010.

GLOVER, B. A. **Characterization and resistance profiles of selected enteric bacteria isolated from non-human primates at a wildlife-human interface**. 2014, 120f., Dissertação de Mestrado – Universidade de Pretoria, África do Sul, 2014.

GOMES, C. M. B.; BATISTA, K. S.; OLIVEIRA, S. A.; BEZERRA, L. M. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, 2011.

GRADY, E. N.; MACDONALD, J.; LIU, L.; RICHMAN, A.; YUAN, Z. C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 203, 2016.

GRIEKSPoor, P.; COLLES, F. M.; MCCARTHY, N. D.; HANSBRO, P. M.; SMITH, C. A.; OLSEN, B.; HALLESQUIST, D.; DONZELA, M. C. J.; WALDENSTROM, J. Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. **Molecular ecology**, v. 22, n. 5, p. 1463-1472, 2013.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; SANCHIS, V.; NGUYEN-THI, C.; HEYNDRIKX, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.

GURLER, N.; OKSUZ, L.; MUFTUOGLU, M.; SARGIN, F. D.; BESISIK, S. K. *Bacillus cereus* catheter related bloodstream infection lymphoblastic leukemia, **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, e. 2012004, 2012.

HAJJAR, R., SCHWENTER, F., SU, S.-H., GASSE, M.-C., & SEBAJANG, H. Community-acquired infection to *Raoultella ornithinolytica* presenting as appendicitis and shock in a healthy individual. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 5, p. 1-3, 2018.

HEUVELINK, A. E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; VAN OOSTEROM, R.; EDINK, K.; VAN DUYNHOVEN, Y. T.; DE BOER, E. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 2, p. 295-302, 2002.

HILL, M. J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 6, 1997.

HOCHÉL, I.; RŮŽIČKOVÁ, H.; KRÁSNÝ, L.; DEMNEROVÁ, K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1257–1265, 2012.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 217-234, 2003.

HUNTER, C. J.; BEAN, J. F. Cronobacter: An emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 8, p. 581–585, 2013.

ICMBio – INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. “Voluntários mapeiam micos na Flona de Capão Bonito”. **ICMBio** 2019. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/10224-voluntarios-mapeiam-mico-leao-preto-na-flona-de-capao-bonito>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

IOVINE, R. O. **Pesquisa de Escherichia coli patogênica em micos leões-da-cara-dourada (Leontopithecus chrysomelas) Kuhl, 1820, de vida livre, durante programa de translocação no Brasil**. 2016. 38 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

IPÊ – INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS. “Conservação do mico-leão-preto”. IPÊ. 2018. Disponível em: [/www.ipe.org.br/projetos/pontal-do-paranapanema/77-conservacao-do-mico-leao-preto](http://www.ipe.org.br/projetos/pontal-do-paranapanema/77-conservacao-do-mico-leao-preto). Acesso em: 28 de novembro de 2018.

IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). **Position Statement on the Translocation of Living Organisms: Introductions, Re-Introductions and Re-Stockings**. Gland, Switzerland: IUCN Council, p. 13, 1987.

IUCN – INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Red list of threatened species**. 2018. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; DAVIS, J.; BARRETT, J. B.; FRYE, J. G. Prevalence, Species Distribution and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Dogs and Cats in the United States. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1269–1278, 2009.

JACOBSEN, S. M.; STICKLER, D. J.; MOBLEY, H. L. T.; SHIRTLIFF, M. E. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21. n. 1, p. 26–59, 2008.

JAY-RUSSELL, M.; HAKE, A. F.; BENGSON, Y.; THIPTARA, A.; NGUYEN, T. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and salmonella strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico Border. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.

KIERULFF, M. C. M.; PORT-CARVALHO, M. *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) Primates, Cebidae. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. **Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, p. 48, 2009.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Micos leões: biologia e conservação**. Tradução de Larissa Stones. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 568, 2008.

KLEIN, M. N.; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016.

KRAEMER, M. U. G., et al. Past and future of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 54–863, 2019.

KWON, T.; CHO, S. Draft genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 NCCP15739, isolated in the Republic of Korea. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, e. 00522-15, 2015.

KUNST, F. et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 249, 1997.

LACERDA, L. C. C. **Bactérias associadas à feridas cutâneas agudas e crônicas em cães**. 2018, 71 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018.

LANGE, C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p. 36-40, 2011.

LANGLEY, J. M.; HANAKOWSKI, M.; LEBLANC, J. C. Unique epidemiology of nosocomial urinary tract infection in children. **American Journal of Infection Control**, v. 29, p. 94–98, 2001.

LAY, J. O. Maldi-Tof mass spectrometry of bacteria. **Mass Spectrometry Rev.** v. 20, n. 4, p. 172-194, 2001.

LAWTON, S. J.; WEIS, A. M.; BYRNE, B. A.; FRITZ, H.; TAFF, C. C.; TOWNSEND, A. K.; WEIMER, B. C.; METE, A.; WHEELER, S.; BOYCE, W. M. Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 3, p. 354–361, 2018.

LEBRETON, F., WILLEMS, R. J. L., GILMORE, M. S. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. In: GILMORE, M. S., CLEWELL, D. B., IKE, Y., SHANKAR, N. (ed) **Enterococci: from Commensals to Leading Causes of**

Drug Resistant Infection (internet). Boston: Massachusetts eye and ear infirmiry. 2014.

LEITE-MARTINS, L.; MEIRELES, D.; BESSA, L. J.; MENDES. A. J. M.; DA COSTA, P. M. Spread of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* within the Household Setting. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, p. 501–507, 2014.

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

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

LIMA, F.; DA SILVA, I. C.; MARTINS, C. S.; VALLADARES-PADUA, C. B. On the occurrence of the black-lion-tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) in Buri, São Paulo, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 2, p. 144–145, 2003.

LIU, G.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Non-pathogenic Neisseria: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. **Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 1297-1312, 2015.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478, 2004.

MCBRIDE, M.; CULLION, C. Successful treatment of a chronic facial abscess using a prolonged release antibiotic copolymer in a golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 41, n. 2, p. 316–319, 2010.

MCFALL-NGAI, M.; et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3229–3236, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1218525110>>. Acesso em: 25 jan 2019.

MCKENZIE, V. J., et al. The effects of captivity on the mammalian gut microbiome. **Integrative and Comparative Biology**, v. 57, n. 4, p. 690–704, 2017.

MENDES, M. S. O. **Resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais selvagens de regiões remotas**. 2012. 50f. Dissertação Mestrado, Faculdade de Ciências – Universidade do Porto, Porto, 2012.

MEZZATESTA, M. L., GONA, F., & STEFANI, S. Enterobacter cloacaecomplex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 887–902, 2012.

MILLER, K. A.; BELL, T. P.; GERMANO, J. M. Understanding publication bias in reintroduction biology by assessing translocations of New Zealand's herpetofauna. **Conservation Biology**, v. 28, n. 4, p. 1045-1056, 2014.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. “Iniciativa evita extinção do mico-leão-preto”. MMA. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/13225-noticia-acom-2016-02>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE.. Instrumentos de gestão. MMA. 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/instrumentos-de-gestao.html>>. Acesso em: 10 de janeiro 2019.

MOISSENET, D.; BECKER, K.; MERENS, A.; FERRONI, A.; DUBERN, B.; VU-THIEN, H. Persistent Bloodstream Infection with *Kocuria rhizophila* Related to a Damaged Central Catheter. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, 2012.

MORAES, I. A.; STUSSI, J. S.; LILENBAUM, W.; PISSINATTI, A.; LUZ, F. P.; FERREIRA, A. M. R. Isolation and identification of fungi from vaginal flora in three species of captive *Leontopithecus*. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 64, n. 3, p. 337-343, 2004.

MORAIS, A. B. C. **Ocorrência de patógenos de origem bacteriana e viral e marcadores de virulência de *Escherichia coli* e *Rhodococcus equi* isolados das fezes de aves silvestres de cativeiro da fauna brasileira**. 2014, 81f. Dissertação de Mestrado. UNESP, Botucatu, 2014.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from italian dairy products. **International Journal of Microbiology**, 2009.

MOURA, A. K. “Mico-leão-preto: de “extinto” a símbolo da luta pela conservação”. SMA (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE). SMA. 2017. Disponível em: <<https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2017/06/mico-leao-preto-de-extinto-a-simbolo-da-politica-de-conservacao/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.

MUGISHA, L., KÖNDGEN, S., KADDU-MULINDWA, D., GAFFIKIN, L., & LEENDERTZ, F. H. Nasopharyngeal colonization by potentially pathogenic bacteria found in healthy semi-captive wild-born chimpanzees in Uganda. **American Journal of Primatology**, v.76, n. 2, p.103–110, 2013.

MURRAY, B. The life and times of the Enterococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 46–65, 1990.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAM, H.; SEO, H. S.; BANG, J.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p.

122-127, 2014.

NELSON, T. M.; ROGERS, T. L.; CARLINI, A. R.; BROWN, M. V. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1132-1145, 2013.

NUNES, O. C. **Animais silvestres e zoonoses: o exemplo da salmonelose em jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*)**. 2007. 75f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

NUNES, A. S. **O papel do contacto célula a célula na manutenção da diversidade bacteriana**. 2012, 54 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2012.

OLIVEIRA, M. M.; LANGGUTH, A. Rediscovery of Marcgrave's capuchin monkey and designation of a neotype for *Simia lavia* Schreber, 1774 (Primates, Cebidae). **Boletim do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, n. 523, p. 1-16, 2006.

OLIVEIRA, K. G.; MIRANDA, S. A.; LEÃO, D. L.; BRITO, A. B.; SANTOS, R. R. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkeys (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-80, 2011.

OLIVEIRA, M. F. **Etograma de mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823) em cativeiro, com ênfase no comportamento reprodutivo**. 2016, 104 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2016.

PARANHOS, K. M. **Estimativas populacionais para espécies raras: o mico-leão-preto *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) como modelo**. 2006. 62 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PASSOS, F. C. Dieta de um grupo de mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan) (*Mammalia, Callitrichidae*), na Estação Ecológica dos Caetetus, São Paulo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 269-278. 1999.

PASSOS, F. C.; LUDWIG, G.; KNOGGE, C.; OLIVEIRA, L. C. "Avaliação do Risco de Extinção de *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) no Brasil. **ICMBio**. 2018. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. "Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7211-mamiferos-leontopithecus-chrysopygus-mico-leao-preto.html>> Acesso em: 28, novembro de 2018.

PEKALA, A.; PAŹDZIOR, E.; ANTYCHOWICZ, J.; BERNAD, A.; GŁOWACKA, H.; WIĘCEK, B.; NIEMCZUK, W. *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). **Aquaculture**, v. 486, p. 285–289, 2018.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins** v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

PONCE-ALONSO, M. et al. Comparison of different methods for identification of species of the genus *Raoultella*: report of 11 cases of *Raoultella* causing bacteraemia and literature review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, p. 252-257, 2016.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**, 9ª Imp. Londrina: Ed. Planta, 2008. 328pp.

PUZENAT, E., et al. Ecthyma gangrenosum avec septicémie à *Pseudomonas stutzeri* s'accompagnant d'une vascularite systémique. **La Revue de Médecine Interne**, v. 25, n. 4, p. 315–318, 2004.

QUEIROZ, A. M. **Materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos: avaliação da atividade antibacteriana in vitro e da compatibilidade tecidual in vivo**. 2008, 118f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 23, p.1-12, 2014.

REDA, RASHA M. et al. In Vitro Selection and Identification of Potential Probiotics Isolated from the Gastrointestinal Tract of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 4, p. 692-703, 2018.

REIS, R. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; ROSA, G. L. M. **Primates do Brasil**: Guia de Campo. Rio de Janeiro: Technical Books, 2015.

REIS, A. A. S.; SANTOS, R. S. **Microbiologia básica**. Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser, 2016. 80p.

REZENDE, G. C. **Sucesso em Programas de Conservação de Espécies da Fauna Ameaçada: A história do Programa de Conservação do Mico-Leão-Preto**, 2013, 125f. Dissertação de Mestrado, IPÊ – Instituto de Pesquisas Ecológicas, Nazaré Paulista, 2013.

RODRIGUES, S. B. M., GAGETTI, B. L., PIRATELLI, A. J. **First record of *Leontopithecus chrysopygus* (Primates: Callitrichidae) in Carlos Botelho State Park**, São Miguel Arcanjo, Brazil. 2014.

RÖHE, F.; ANTUNES, A. P.; TÓFOLI, C. F. The Discovery of a New Population of Black Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*) in the Serra de Paranapiacaba, São Paulo, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 11. N. 2, p. 75-76, 2003.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. Family Callitrichidae (Marmosets and Tamarins). In: MITTERMEIER, R. A., RYLANDS, A. B. E WILSON, D. E. **Handbook**

of the Mammals of the World. Primates. Lynx Edicions, Barcelona, v. 3, p. 262-346. 2013.

SALES, I. S. **Avaliação da sanidade e da microbiota de híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) e mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) de vida livre no estado do Rio de Janeiro**. 2015, 108f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, 2015.

SALYERS, A., GUPTA, A., & WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412–416, 2004.

SEDLAK J. Present knowledge and aspects of *Citrobacter*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 62, 41–59, 1973.

SMA (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE). **Plano de ação para conservação de primatas do Estado de São Paulo. Comissão Permanente de Proteção dos Primatas Nativos do Estado de São Paulo – PRÓ-primatas paulistas**. Governo do Estado de São Paulo. Agosto, 2015.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; RESENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14, p. 1398-1418, 2012.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227–238, 2013.

SOUZA-ARAÚJO, N. L. Reprodução de primatas neotropicais: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, Patos- PB, v. 22, n. 1, p. 296–307, 2012.

SOUZA-POLLO, A.; LACERDA, L. C. C.; CARBONI, R. C. D.; AMARAL, L. A. Epidemiologia molecular e diversidade genética de microrganismos. In: BASTOS, C. R.; DESIDERIO, J. A.; LEMOS, M. V. F.; AUGUSTO, M. L. V. **Tópicos Especiais em Genética Aplicada**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, cap. 5, p. 41-52, 2016.

SPIEZIO, C.; PIVA, F.; REGAIOLLI, B.; VAGLIO, S. Positive reinforcement training: A tool for care and management of captive vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*). **Animal Welfare**, v. 24, p. 283–290, 2015.

SRINIVASAN, R.; KARAOZ, U.; VOLEGOVA, M.; MACKICHAN, J.; KATO-MAEDA, M.; MILLER, S.; NADARAJAN, R.; BRODIE, E. L.; LYNCH, S. V. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. 1-22, 2015.

STENFORS ARNESEN, LOTTE P.; FAGERLUND, ANNETTE; GRANUM, PER EINAR. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 579-606, 2008.

STUMPF, R. M. et al. Microbiomes, metagenomics, and primate conservation: New strategies, tools, and applications. **Biological Conservation**, v. 199, p. 56-66, 2016.

SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D. TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers. **Cancer Epidemiologic Biomarkers**, Philadelphia, v. 5, n.2, p. 139-140, 1996.

TATARA, R.; NAGAI, T.; SUZUKI M.; FUJIWARA, S.; NORIZUKI, M.; MUROI, K.; OZAWA, K. Sepsis and meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome. **Internal Medicine**, v. 52, n. 17, p. 1987-1990, 2013.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

TWENHAFEL, N. A., WHITEHOUSE, C. A. Multisystemic abscesses in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) with invasive *Klebsiella pneumoniae* identification of the hypermucoviscosity phenotype. **Vet. Pathol.**, 45, 226-231, 2008.

VALLADARES-PADUA, C. B.; MARTINS, C. S.; RUDRAN, R. Manejo integrado de espécies ameaçadas. In: CULLEN JR., L.; VALLADARES-PADUA, C.B.; RUDRAN, R. (Orgs.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. 2a Ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.

VALLADARES-PADUA, C. B., MARTINS, C. S. *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823). In: MACHADO, A. M. M., DRUMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte- MG: Fundação Biodiversitas, 2010.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, E. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900-907, 2010.

VELA, A. I.; GUTIE´RREZ, M. C.; FALSEN, E.; ROLLA, E.; SIMARRO, I.; GARCIA, P.; DOMINGUEZ, L.; VENTOSA, A.; GARAYZA, J. F. F. *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 11, p. 2671-2676, 2006.

VERONA, C. E. S. **Parasitos em sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) no Rio de Janeiro**. 2008. 116f. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

VLČKOVÁ, K.; GOMEZ, A.; PETRŽELKOVÁ, K. J.; WHITTIER, C. A.; TODD, A.; NELSON, K.; WILSON, B. A.; STUMPF, R. M.; MODRÝ, D.; WHITE, B. A.; LEIGH, S. R. Effect of antibiotic treatment on the gastrointestinal microbiota of free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla G. gorilla*). **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 943-954, 2016.

XAVIER, D. B. et al. Absence of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in nonhuman primates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 491-496, 2010.

WEYAND, N. J. et al. *Neisseria* infection of rhesus macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 3059-3064, 2013.

WENZLER, E., KAMBOJ, K., BALADA-LLASAT, J. M. Severe sepsis secondary to Persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* Bacteremia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 35, p. 93–95, 2015.

WIENEMANN, T.; SCHMITT-WAGNER, D.; MEUSER, K.; SEGELBACHER, G.; SCHINK, B.; BRUNE, A., BERTHOLD, P. The bacterial microbiota in the ceca of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) differs between wild and captive birds. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 542-551, 2011.

WIJMAN, J. G.; DE LEEUW, P. P.; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M. H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

WO, Y. LU Q. B.; HUANG D. D., LI X. K., GUO C. T., WANG H. Y., ZHANG X. A., LIU W., CAO W. C. Epidemical features of HAdV-3 and HAdV-7 in pediatric pneumonia in Chongqing, China. **Archives of virology**, v. 160, n. 3, p. 633-638, 2015.

WOODS, S. E., et al. Characterization of multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* isolated from cephalic recording chambers in research macaques (*Macaca* spp.). **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169293, 2017.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

ZANIOLO, M. M. et al. Identification of enterobacteria in free-living nonhuman primates in an urban park in the northern Region of the State of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1115-1124, 2018.

ZVOBODA, D. A. **Diversidade de espécies e determinantes de resistência de Enterococcus sp. isolados de amostras orais de macacos-prego da espécie Sapajus nigritus oriundos do município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.** 2017, 23f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

8. ANEXOS

Anexo 1

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



São Carlos, 19 de outubro de 2018

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Bruna Talita Fatoretto**, CPF 368.906.488-03, responsável pelo projeto intitulado: "Diversidade bacteriana em cavidade oral e retal de mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (MIKAN, 1823)", declaro que:

- li o disposto na Lei n 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;
- este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Executor: Bruna Talita Fatoretto

Assinatura:  Data: 19/10/2018

Responsável: Bruna Talita Fatoretto

Assinatura:  Data: 19/10/2018

Anexo 2



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36839-1	Data da Emissão: 26/10/2012 17:13	Data para Revalidação*: 25/11/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Rodrigo Pinho Gomez Iopez	CPF: 289.629.738-39
Título do Projeto: Avaliação de patógenos de interesse à medicina da conservação de Mico-leão-preto (<i>Leontopithecus chrysopygus</i> Mikan, 1823) no Município de Buri - SP.	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO	CNPJ: 60.889.573/0001-40

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 17635241



Página 4/4

Anexo 3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 65412-1	Data da Emissão: 18/10/2018 15:40:07	Data da Revalidação*: 18/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Irys Hany Lima Gonzalez	CPF: 337.538.758-05
-------------------------------	---------------------

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e análise das amostras	10/2018	10/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Patricia Locosque Ramos	Análises microbiológicas e moleculares	263.190.078-26	Brasileira
2	Bruna Talita Faretto	Análises microbiológicas e moleculares	368.906.488-03	Brasileira
3	Caio Filipe da Motta Lima	Coleta de amostras e análises de dados	368.199.448-02	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0654120120181018

Página 1/3

Anexo 4

Identificação do indivíduo CAD (<i>ex situ</i>)	Identificação Isolado	Tipo de amostra	Resultado	Metodologia utilizada
27098	4189 A	Retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	4189 B	Retal	BGP	GRAM
	4189 C	Retal	<i>Kocuria rhizophila</i>	MALDI
	4189 D	Retal	CGP	GRAM
	4189 E	Retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
29597	4427 A	Oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4427 B	Oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4427 C	Oral	BGN	GRAM
	4427 D	oral	CBGN	GRAM
	4427 E	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4427 F	retal	<i>Staphylococcus hominis</i>	MALDI
	4427 G	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4427 H	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4427 I	retal	BGN	GRAM
29653	4192 A	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	4192 B	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4192 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
29697	550 A	oral	CGP	GRAM
	550 B	oral	BGP	GRAM
	550 C	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	550 D	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	550 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
29791	4727 A	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4727 B	oral	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	MALDI
	4727 C	oral	<i>Streptococcus sp.</i>	MALDI
	4727 D	oral	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	MALDI
	4727 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4727 F	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4727 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4727 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4727 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30168	4188 A	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	4188 B	retal	<i>Kocuria rhizophila</i>	MALDI
	4188 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4188 D	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30498	4187 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4187 B	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30518	4404 A	retal	CGP	GRAM
	4404 B	retal	CGN	GRAM
	4404 C	retal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MALDI
	4404 D	retal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MALDI
	4404 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI

	4404 F	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	4404 G	retal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MALDI
	4404 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4404 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4404 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30595	4403 A	retal	CGP	GRAM
	4403 B	retal	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4403 C	retal	<i>Neisseria perflava</i>	MALDI
	4403 D	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4403 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4403 F	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4403 G	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	4403 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4403 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30596	4191 A	retal	<i>Bacillus cereus</i>	MALDI
	4191 B	retal	<i>Raoultella planticola</i>	MALDI
	4191 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
30774	3563 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	3563 B	retal	BGP	GRAM
	3563 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	3563 D	retal	<i>Klebsiella</i> sp.	MALDI
	4377 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4377 B	retal	<i>Enterococcus faecium</i>	MALDI
	4377 C	retal	<i>Enterococcus</i> sp.	MALDI
	4377 D	retal	<i>Enterococcus cecorum</i>	MALDI
30775	3562 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	3562 B	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	3562 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	3562 D	retal	<i>Klebsiella</i> sp.	MALDI
	4376 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4376 B	retal	<i>Enterococcus faecium</i>	MALDI
	4376 C	retal	<i>Enterococcus cecorum</i>	MALDI
	4376 SS	retal	<i>Citrobacter youngae</i>	MALDI
30899	4190 A	retal	<i>Enterococcus faecalis</i>	MALDI
	4190 B	retal	<i>Bacillus</i> sp.	MALDI
	4190 C	retal	<i>Kocuria rhizophila</i>	MALDI
	4190 D	retal	<i>Delftia acidovorans</i>	MALDI
	4190 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31074	4608 A	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4608 B	retal	<i>Streptococcus</i> sp.	MALDI
	4608 C	retal	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4608 D	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4608 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31075	4426 A	oral	CGP	GRAM
	4426 B	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4426 C	oral	<i>Bacillus</i> sp.	MALDI

	4426 D	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4426 E	retal	CGP	GRAM
	4426 F	retal	<i>Enterococcus faecalis</i>	MALDI
	4426 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31076	4429 A	oral	BGP	GRAM
	4429 B	oral	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MALDI
	4429 C	oral	<i>Staphylococcus sp.</i>	MALDI
	4429 D	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4429 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4429 F	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31260	2702 A	oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	MALDI
	2702 B	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	2702 C	oral	<i>Neisseria macacae</i>	MALDI
	2702 D	oral	BGN	GRAM
	2702 E	oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	MALDI
	2702 F	retal	<i>Cronobacter sakazakii</i>	MALDI
	2702 G	retal	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	2702 H	retal	BGP	GRAM
	2702 I	retal	<i>Cronobacter sp.</i>	MALDI
	2702 J	retal	<i>Enterobacter ludwigii</i>	MALDI
	2702 K	retal	<i>Citrobacter youngae</i>	MALDI
31261	2701 A	oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	MALDI
	2701 B	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	2701 C	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	2701 D	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2701 E	oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	MALDI
	2701 F	retal	<i>Cronobacter sp.</i>	MALDI
	2701 G	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	2701 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2701 I	retal	<i>Escherichia sp.</i>	MALDI
31379	2703 A	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 B	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	2703 C	oral	<i>Bacillus sp.</i>	MALDI
	2703 D	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	2703 E	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 F	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 I	retal	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MALDI
	2703 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 K	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2703 L	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4428 A	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4428 B	oral	CGP	GRAM
	4428 C	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4428 D	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI

	4428 E	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4428 F	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4428 G	retal	BGN	GRAM
	4428 H	retal	<i>Streptococcus sp.</i>	MALDI
	4428 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4428 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31380	2699 A	oral	<i>Enterobacter sp.</i>	MALDI
	2699 B	oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	MALDI
	2699 C	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	2699 D	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2699 E	oral	<i>Enterobacter ludwigii</i>	MALDI
	2699 F	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2699 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2699 H	retal	CGP	GRAM
	2699 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2699 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	2699 K	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4725 A	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4725 B	oral	CGN	GRAM
	4725 C	oral	CGP	GRAM
	4725 D	oral	CGP	GRAM
	4725 E	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4725 F	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4725 G	retal	BGP	GRAM
	4725 H	retal	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4725 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4725 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31419	4722 A	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4722 B	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4722 C	oral	<i>Escherichia sp.</i>	MALDI
	4722 D	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4722 E	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4722 F	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4722 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4722 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4722 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4722 J	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31420	4723 A	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4723 B	oral	<i>Neisseria sp.</i>	MALDI
	4723 C	oral	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4723 D	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4723 E	oral	<i>Escherichia sp.</i>	MALDI
	4723 F	oral	<i>Escherichia sp.</i>	MALDI
	4723 G	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4723 H	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4723 I	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI

	4723 J	retal	<i>Escherichia</i> sp.	MALDI
31583	4631 A	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4631 B	retal	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	4631 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4631 D	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4631 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
31584	4632 A	retal	BGP	GRAM
	4632 B	retal	<i>Enterococcus faecalis</i>	MALDI
	4632 C	retal	<i>Staphylococcus aureus</i>	MALDI
	4632 D	retal	BGN	GRAM
	4632 E	retal	<i>Pseudomonas lundensis</i>	MALDI
	4632 F	retal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MALDI
	4632 H	retal	BGP	GRAM
	4877 A	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4877 B	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4877 C	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI
	4877 D	retal	<i>Proteus mirabilis</i>	MALDI
	4877 E	retal	<i>Escherichia coli</i>	MALDI

Anexo 5

Identificação do indivíduo (<i>in situ</i>)	Identificação Isolado	Tipo de amostra	Resultado	Metodologia utilizada
Animal 1 ^a	M1O1	oral	<i>Staphylococcus aureus</i>	MALDI
	M1O2	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	M1O3	oral	<i>Staphylococcus</i> sp.	MALDI
	M1R1	retal	<i>Bacillus cereus</i>	MALDI
	M1R2	retal	<i>Neisseria</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	M1R3	retal	<i>Lysinibacillus</i> sp.	MALDI
	M1R4	retal	<i>Lysinibacillus</i> sp.	MALDI
Animal 2A	M2O1	oral	<i>Staphylococcus</i> sp.	MALDI
	M2O2	oral	<i>Neisseria</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	M2O3	oral	<i>Bacillus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	M2O4	oral	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MALDI
	M2R1	retal	<i>Bacillus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	M2R2	retal	<i>Staphylococcus aureus</i>	MALDI
	M2R3	retal	<i>Enterococcus faecalis</i>	MALDI
	M2R4	retal	<i>Bacillus subtilis</i>	MALDI
Animal 3A	M2R5	retal	<i>Staphylococcus aureus</i>	MALDI
	M3O1	oral	<i>Bacillus</i> sp.	MALDI
	M3O2	oral	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MALDI
	M3O3	oral	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MALDI
	M3R1	retal	<i>Enterococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
M3R2	retal	<i>Enterococcus</i> sp.	MALDI	

	M3R3	retal	<i>Lysinibacillus</i> sp.	MALDI
	M3R4	retal	<i>Bacillus mycoides</i>	MALDI
Animal 4A	M4O1	oral	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MALDI
	M4O2	oral	NÃO CRESCEU	NÃO CRESCEU
	M4O3	oral	<i>Paenibacillus</i> sp.	MALDI
	M4R1	retal	<i>Micrococcus</i> sp.	MALDI
	M4R2	retal	<i>Lactococcus lactis</i>	MALDI
	M4R3	retal	<i>Bacillus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	M4R4	retal	<i>Lactococcus lactis</i>	MALDI
	Animal 5A	M5O1	oral	<i>Staphylococcus</i> sp.
M5O2		oral	<i>Staphylococcus</i> sp.	MALDI
M5R1		retal	<i>Bacillus</i> sp.	MALDI
M5R2		retal	CGP	GRAM
animal 1	A1I1	retal	<i>Lactococcus</i> sp.	MALDI
	A1I2	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	MALDI
	A1I3	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A1I4	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A1I5	retal	<i>Enterobacter aerogenes</i>	MALDI
animal 2	A2I1	retal	<i>Staphylococcus sciuri</i>	MALDI
	A2I2	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A2I3	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A2I4 A	retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A2I4 B	Retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
animal 3	A3I1	Retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A3I2	Retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A3I3	Retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO
	A3I3A	Retal	<i>Staphylococcus</i> sp.	MALDI
	A3I3B	Retal	CGP	GRAM
	A3I4	Retal	BGN	GRAM
	A3I5 A	Retal	<i>Bacillus</i> sp.	SEQUENCIAMENTO

Anexo 7

M3R1										
AJ301830.1_Enterococcus_faecium	0,02636									
AB012212.1_Enterococcus_faecalis	0,04252	0,03656								
AF061009.1_Enterococcus_cecorum	0,04762	0,05102	0,05272							
JX948102.1_Enterococcus_alcedinis	0,04592	0,04422	0,04167	0,04932						
KR827627.1_Enterococcus_bulliens	0,04082	0,03486	0,03997	0,03912	0,02891					
AF335596.2_Enterococcus_villorum	0,02721	0,00765	0,03571	0,04932	0,03997	0,03146				
MF326566.1_Enterococcus_wangshanyuanii	0,03401	0,02806	0,02551	0,05442	0,04592	0,04337	0,02721			
Y17302.1_Enterococcus_hirae	0,02381	0,00595	0,03401	0,04847	0,04252	0,03571	0,00680	0,02296		
AY943820.1_Enterococcus_caccae	0,03486	0,03061	0,02636	0,05442	0,04507	0,04167	0,03146	0,00765	0,02891	
X80725.1_Escherichia_coli	0,23384	0,23724	0,23810	0,24235	0,23810	0,23554	0,23980	0,23724	0,23554	0,23639

Matriz de similaridade obtida a partir de alinhamento de sequencias geradas para o gênero *Enterococcus* sp. usando o modelo distancia p.

Anexo 8

M1R2										
M202	0,00248									
NR_118659.1_Neisseria_macacae	0,04125	0,04043								
HF558366.1_Neisseria_perflava	0,03300	0,03218	0,02475							
JN175351.1_Neisseria_meningitidis	0,03383	0,03300	0,02970	0,02228						
NR_026079.2_Neisseria_gonorrhoeae	0,04455	0,04373	0,04043	0,03135	0,01403					
NR_121688.1_Neisseria_sicca	0,04125	0,04043	0,00248	0,02475	0,02970	0,04125				
AJ239288.1_Neisseria_animalis	0,04538	0,04455	0,04290	0,02888	0,03630	0,04373	0,04290			
AJ239291.1_Neisseria_subflava	0,03795	0,03713	0,01898	0,00825	0,02558	0,03548	0,01898	0,03053		
DQ006843.1_Neisseria_zoodegmatis	0,04703	0,04620	0,04043	0,03300	0,03630	0,04290	0,04043	0,04208	0,03135	
X80725.1_Escherichia_coli	0,18482	0,18234	0,18399	0,18399	0,18894	0,19059	0,18317	0,18482	0,18234	0,18234

Matriz de similaridade obtida a partir de alinhamento de sequencias geradas para o gênero *Enterococcus* sp. usando o modelo distancia p.

