

# CONTAGEM DE BACTÉRIAS DO TRATO GASTROINTESTINAL DE MORCEGOS DA ESPÉCIE *Molossus rufus* E SEU PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS<sup>1</sup>

BELTRAMI, José Matheus<sup>2</sup>  
SERENINI, Grazielli de Fátima<sup>3</sup>  
GERONIMO, Edson<sup>4</sup>  
CAETANO, Isabel Cristina da Silva<sup>5</sup>  
SANTOS, Isabela Carvalho dos<sup>6</sup>  
OTUTUMI, Luciana Kazue<sup>7</sup>

## RESUMO

Morcegos da espécie *Molossus rufus* são pertencentes a família Molossidae que em busca de alimento podem ser encontrados compartilhando o mesmo ambiente que o homem, trazendo consigo diversos patógenos. Foram capturados cinco espécimes de *Molossus rufus* do forro de uma residência da microrregião de Cianorte-PR, para isolamento e contagem de *Lactobacillus* spp. e enterobactérias do estômago e intestino delgado. A partir das enterobactérias isoladas foi avaliado o perfil de resistência aos antimicrobianos. A contagem de *Lactobacillus* spp. do estômago resultou em uma variação de  $7.9 \times 10^3$  a  $5.3 \times 10^4$  UFC/mL enquanto para o intestino delgado variou entre  $1.05 \times 10^5$  a  $1.2 \times 10^7$  UFC/g. Em relação a contagem de enterobactérias verificou-se variação de  $7 \times 10^2$  a  $2 \times 10^4$  UFC/mL para as amostras do estômago e  $3.9 \times 10^3$  e  $2.7 \times 10^5$  UFC/g para intestino delgado. Quanto à resistência aos antimicrobianos foram considerados como multirresistente, os isolados que não foram suscetíveis ao menos um agente em no mínimo três classes de antimicrobianos, o que representou apenas quatro isolados (4/19=21%). Esses resultados são importantes tendo em vista a possível transmissão de patógenos entre humanos e quirópteros levando em consideração o local de coleta dos animais além da presença de microrganismos resistentes em sua microbiota gastrointestinal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Enterobactéria. Molossideo. Morcego insetívoro. Quirópteros. Resistencia a antimicrobianos.

## GASTROINTESTINAL TRACT BACTERIA OF *Molossus rufus* SPECIES COUNT AND ITS PROFILE OF RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS

## ABSTRACT

*Molossus rufus* bats belong to the Molossidae family, which in search of food can be found sharing the same environment as humans, bringing with them several pathogens. Five specimens of *Molossus rufus* were captured from the liner of a residence from Cianorte-PR microregion for isolation and counting of *Lactobacillus* spp. and stomach and small intestine enterobacteria. From the isolated enterobacteria the antimicrobial resistance profile was evaluated. The count of stomach *Lactobacillus* spp. resulted in a variation of  $7.9 \times 10^3$  to  $5.3 \times 10^4$  CFU/mL whereas for the small intestine it varied from  $1.05 \times 10^5$  to  $1.2 \times 10^7$  CFU/g. Regarding the enterobacterial count, there was variation of  $7 \times 10^2$  to  $2 \times 10^4$  CFU/mL for the stomach samples and  $3.9 \times 10^3$  and  $2.7 \times 10^5$  CFU/g for the large intestine. Regarding antimicrobial resistance, isolates that were not susceptible to at least one agent in at least three antimicrobial classes were considered multiresistant, which represented only four isolates (4/19 = 21%). These results are important in view

<sup>1</sup> Os autores agradecem a Universidade Paranaense pelo financiamento da pesquisa. O presente trabalho foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

<sup>2</sup> Biólogo, Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Universidade Paraense. E-mail: [jose.b@edu.unipar.br](mailto:jose.b@edu.unipar.br)

<sup>3</sup> Bióloga, Mestra em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Universidade Paraense. E-mail: [grazielli.serenini@edu.unipar.br](mailto:grazielli.serenini@edu.unipar.br)

<sup>4</sup> Biólogo, Doutorando em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Taxista PROSUP, Universidade Paranaense. E-mail: [geronimoedson74@gmail.com](mailto:geronimoedson74@gmail.com)

<sup>5</sup> Bióloga, Doutoranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos Universidade Paranaense. E-mail: [belcaetano@hotmail.com](mailto:belcaetano@hotmail.com)

<sup>6</sup> Médica Veterinária, Doutoranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos Universidade Paranaense. E-mail: [isacarsan@gmail.com](mailto:isacarsan@gmail.com)

<sup>7</sup> Médica Veterinária, Docente da Pós-graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, Universidade Paranaense. E-mail: [otutumi@prof.unipar.br](mailto:otutumi@prof.unipar.br)

of the possible transmission of pathogens between humans and chiropters taking into account the collection site of the animals and the presence of resistant microorganisms in their gastrointestinal microbiota.

**KEYWORDS:** Enterobacteria. Moloside. Insectivorous bat. Chiroptera. Antimicrobial resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

Os morcegos constituem a segunda maior ordem da classe Mammalia, apresentando 18 famílias com duas subordens (Microchiroptera e Megachiroptera), aproximadamente 202 gêneros e 1.120 espécies (SIMMONS, 2005). Estes animais desenvolveram hábitos e características que proporcionaram diferenciar-se de outros mamíferos sendo os únicos a apresentarem característica de voo livre (ALTRINGHAM, 2011).

Em muitos aspectos a capacidade de voo dos morcegos faz com que estes tenham um papel fundamental dentro da natureza, que no caso de morcegos frugívoros, ao se alimentarem realizam a dispersão de sementes afetando diretamente a biodiversidade de áreas fragmentadas (ABEDILARTEY *et al*, 2016).

No caso dos morcegos insetívoros sua população pode influenciar diretamente a quantidade de insetos fazendo o controle dos mesmos em áreas urbanas assim como descrito por Rodríguez-Aguilar *et al* (2017) que identificaram a presença de morcegos da espécie *Molossus rufus* (*M. rufus*) alimentando-se de insetos atraídos pela iluminação pública, não obstante também auxiliando no controle populacional de insetos em áreas agriculturáveis responsáveis por perdas econômicas (PUIG-MONTSERRAT *et al*, 2015).

A espécie *M. rufus* (E. Geoffroy, 1805) faz parte do gênero *Molossus*, representado por morcegos com cauda, apresenta pelagem parda-escura, hábito alimentar exclusivamente insetívoro, e formação de colônia com diferentes espécies a qual divide abrigos sendo a mais comum as da espécie *Molossus molossus* que apresenta comportamento similar a mesma porém sai de seu abrigo 15 minutos mais tarde (REIS; PERACCHI; LIMA, 2002).

Apesar de sua importância no meio ambiente, os morcegos também podem servir como reservatório de patógenos que são responsáveis por grandes surtos de doenças de caráter cosmopolita (FISCHER *et al*, 2016). Além disso, com o crescimento populacional, áreas urbanas e rurais passaram por drásticas modificações onde a perda de recursos naturais fez com que animais com maior capacidade de adaptação buscassem recursos alimentares e abrigos em meio urbano e peri-urbano (MACKENSTEDT; JENKINS; ROMIG, 2015), que por sua proximidade com residências da área rural, permitiu que a espécie *M. rufus* se tornasse foco deste trabalho.

Segundo Laxminarayan *et al* (2013) a multirresistência bacteriana pode ser propagada mais facilmente pela água e alimentos contaminados, principalmente em países com baixo desenvolvimento social ou econômico. Portanto, a partir desta contaminação, animais a procura de alimento podem tornar-se reservatórios de possíveis patógenos, resultando na disseminação da resistência destas bactérias normalmente encontradas nas áreas urbanas (CARROLL, 2015).

Dentre os micro-organismos que os morcegos podem entrar em contato ou estar carreando em sua microbiota gatrointestinal, estão as bactérias pertencentes à ordem Enterobacteriales, a qual é constituída por bactérias, algumas com potencial patogênico, responsáveis por infecções relacionadas ao trato urinário, pulmonar e gastrointestinal e principalmente infecções ligadas a feridas em ambientes hospitalares (MARTINEZ e TADDEI, 2015). Além disso, os micro-organismos da ordem Enterobacteriales classificados como patogênicos, não afetam apenas a saúde humana (GROMAN, 2014), podendo também estar associados com infecções em animais incluindo-se os morcegos. Mühlendorfer (2013) em seu estudo de revisão relatou maior prevalência de enterobactérias do gênero *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Campylobacter* spp. quando isoladas de morcegos.

No trabalho realizado por Sens Junior *et al* (2018), os autores observaram elevada resistência a antimicrobianos da classe das penicilinas (35.6 -72.4%) de isolados de enterobactérias oriundas de espécies de morcegos da família *Phyllostomidae*, demonstrando a importância do estudo da resistência microbiana em morcegos, visto que, existe o risco destes animais disseminarem micro-organismos resistentes por compartilharem o mesmo ambiente com seres humanos.

Cabe salientar ainda a importância das mesmas no organismo animal como já descrito em morcegos (PRINGSULAKA *et al*, 2015). Como exemplo, um dos gêneros de bactérias presentes em seu organismo e que também foi foco deste estudo, são os *Lactobacillus* spp., responsáveis pela melhoria dos mecanismos de defesa do organismo e comumente ligados à melhora da absorção de nutrientes (DALE, 1992).

Sendo assim, levando-se em consideração a proximidade dos morcegos com áreas urbanas, a baixa quantidade de trabalhos avaliando a microbiota do estômago e intestino desses animais e a possibilidade dos mesmos de albergar uma variedade de bactérias com perfil de resistência aos antimicrobianos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contagem de *Lactobacillus* spp. e enterobactérias no estômago e intestino delgado de morcegos da espécie *M. rufus* e o perfil de resistência aos antimicrobianos de uso humano e veterinário frente as espécies de enterobactérias isoladas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A área de estudo está localizada na região noroeste do Paraná a 533 km de Curitiba, sendo uma área remanescente da Reserva Biológica das Perobas, especificamente da microrregião de Cianorte, de latitude -23°51'38.99"S e longitude -52°60'91.70"W, caracterizada também como região fronteiriça.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense, protocolo 34348/2017, autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (BRASIL, 2012) (ICMBio no. 60061-1) e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A30FF13.

A região da pesquisa é classificada como uma zona de clima subtropical, com temperaturas médias acima de 18°C nos meses frios (abril-agosto) e 22°C nos meses mais quentes (setembro-março), geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo, sem estação seca definida (IAPAR, 2015). Dentro da área de coleta dos animais, a temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas, onde a temperatura mínima foi de 23.5°C e máxima 25.5°C, com umidade relativa do ar mínima de 58.1% e máxima de 70.3%.

Para captura foram utilizadas redes de neblina e foi feita a identificação por meio de chaves de identificação própria para estes animais de acordo com a literatura (VIEIRA, 1942; VIZOTTO; TADDEI, 1973), sendo então mensurados o antebraço, corpo, crânio, cauda e peso com auxílio de paquímetro digital que foram usados apenas para identificação dos morcegos.

O número de animais a ser coletado foi determinado de acordo com os princípios de Russell, Burch e Hume (1959), priorizando obter dados suficientes para comparação a partir de um menor número de espécimes, sendo assim foram capturados cinco morcegos, sendo três machos e duas fêmeas, da espécie *Molossus rufus*. Os animais foram encaminhados vivos ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Biotativos da Universidade Paranaense para colheita e processamento das amostras.

A eutanásia dos cinco morcegos foi realizada em câmara saturada com isoflurano, sendo submetido ao processamento, um animal por vez. Após eutanásia, foi feita laparotomia exploratória e durante a manipulação foi utilizado equipamento estéril no intuito de se evitar contaminação durante a colheita de material a ser analisada. A colheita do material estomacal foi feita com auxílio de um swab introduzido pelo esfíncter esofágico inferior ficando em contato com o conteúdo estomacal e do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) por meio da pesagem de 0.1g de tecido, os

quais foram mantidos em tubos de tampa rosca contendo água peptonada tamponada (APT) estéril até processamento.

Para as amostras do estômago os tubos continham 1 mL de APT. Para as amostras do intestino delgado foram adicionados pérola de vidro para auxiliar na homogeneização das mesmas e 0.9 mL de APT. A partir da diluição  $10^{-1}$  foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, sempre com a transferência asséptica de 0.1 mL da amostra para tubos contendo 0.9 mL de APT ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ).

A contagem de enterobactérias do estômago e intestino delgado foi realizada pela semeadura de 100  $\mu$ L de cada uma das diluições em Agar *MacConkey*, seguida da incubação a 36º C por 24 horas (BRASIL, 2003). Para a contagem de *Lactobacillus* spp. do estômago e intestino delgado foi utilizado o meio De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) que neste caso, o método utilizado foi o *pour-plate* com a inoculação de 100  $\mu$ L de cada uma das diluições. Após a amostra ser diluída em ágar, uma segunda camada do ágar foi vertida sobre a primeira já solidificada, visando garantir a anaerobiose das amostras, que em seguida foram incubadas a 37°C por 72 horas. Os resultados foram multiplicados pela recíproca da diluição e expressos como número de unidades formadoras de colônias ou UFC/mL (estômago) e UFC/g (intestino delgado).

Posteriormente, as colônias predominantes isoladas em ágar *MacConkey* foram submetidas à observação macroscópica (características de colônia) e características microscópicas (morfotintoriais) seguido da identificação bioquímica das bactérias pertencentes à ordem Enterobacteriales, por meio do kit comercial da Newprov®, seguindo as recomendações do fabricante. A identificação das espécies bacterianas foi realizada segundo Quinn *et al* (1994).

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias isoladas do intestino delgado e estômago foram realizados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2018) método utilizado foi o de disco difusão em ágar, empregando discos de antimicrobianos selecionados de acordo com sua importância na clínica humana e veterinária. Foram testados os seguintes antimicrobianos: enrofloxacina (ENO, 5 $\mu$ g), ácido nalidíxico (NAL, 30 $\mu$ g), ciprofloxacina (CIP, 5 $\mu$ g), tobramicina (TOB, 10 $\mu$ g), amicacina (AMI, 30 $\mu$ g), gentamicina (GEN, 10 $\mu$ g), imipenem (IPM, 10 $\mu$ g), ceftazidina (CAZ, 30 $\mu$ g), cefotriaxona (CRO, 30 $\mu$ g), cefotaxima (CTX, 30 $\mu$ g), ceftiofur (CTF, 30 $\mu$ g), cefoxitina (CFO, 30 $\mu$ g), ampicilina (AMP, 10 $\mu$ g), amoxicilina (AMO-10 $\mu$ g), amoxicilina + clavulanato (AMC, 30 $\mu$ g), penicilina (PEN, 10 $\mu$ g), aztreonan (ATM, 30 $\mu$ g), tetraciclina (TET, 30 $\mu$ g), cloranfenicol (CLO, 30 $\mu$ g).

Após semeadura, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C até 15 minutos após a aplicação dos discos. Após 24 horas de incubação, o tamanho dos halos fora medido, interpretados e

classificados (sensível, intermediário e resistente) de acordo com o CLSI (2018) e representados por meio de gráficos projetados a partir do programa Origin (Pro) 9.5 (2018).

Os isolados bacterianos foram classificados em relação ao perfil de multiresistência às drogas (MDR –multidrug resistance) de acordo com o descrito por Sweeney *et al* (2018), definindo como MDR, isolados que não são suscetíveis a no mínimo um agente em no mínimo três classes de antimicrobianos, sendo os resultados apresentados independente da espécie, mas especificamente para cada uma das origens, estômago ou intestino delgado.

Os resultados da contagem de bactérias foram expressos como mínimo e máximo para o estômago e intestino delgado. Foi elaborado um gráfico de barras relacionando o percentual de enterobactérias isoladas independente do segmento e posteriormente separado em estômago e intestino delgado. Os resultados do perfil de resistência para os antimicrobianos que apresentaram maior variação em relação aos resultados (sensível, intermediário ou resistente), independentemente da enterobactéria isolada foram expressos na forma de gráficos de barras para cada um dos segmentos estudados (estômago e intestino delgado).

De forma complementar foi também realizada análise exploratória multivariada, determinando a análise de componentes principais (ACP), que permitiu a avaliação em conjunto dos resultados da média dos tamanhos dos halos de inibição para os antimicrobianos da classe das penicilinas testadas em relação aos três micro-organismos com maior prevalência dentre ambos os segmentos. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (Biplot), auxiliando na caracterização dos grupos das variáveis analisadas MOITA-NETO; MOITA, 1998). Primeiramente foi calculada a média dos tamanhos dos halos de cada antibiótico da classe das penicilinas e posteriormente calculada a média da classe. Esses dados foram transformados em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR *et al*, 2005).

O critério de *Kaiser* foi utilizado para eleger os componentes principais. Um autovalor preserva informação relevante quando é superior à unidade. Ambas as análises foram realizadas no programa Statistica 7 (STATSOFT INC., 2018).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com relação à contagem de *Lactobacillus* spp. do estômago foi possível observar que o menor valor encontrado foi de  $7.9 \times 10^3$  UFC/mL enquanto o maior foi de  $5.3 \times 10^4$  UFC/mL (média de  $1.8 \times 10^4$  UFC/mL). Quando analisadas as amostras do intestino delgado, maior contagem de

*Lactobacillus* spp. foram encontrados (média de  $3.4 \times 10^6$  UFC/mL) e variaram entre  $1.05 \times 10^5$  a  $1.2 \times 10^7$  UFC/g.

Estudos avaliando a contagem de *Lactobacillus* spp. em morcegos ainda são escassos, porém, as mesmas podem apresentar capacidade antimicrobiana frente diferentes patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Klebsiella* spp. (PRINGSULAKA *et al*, 2015), que por sua vez auxilia na manutenção da vida dos animais.

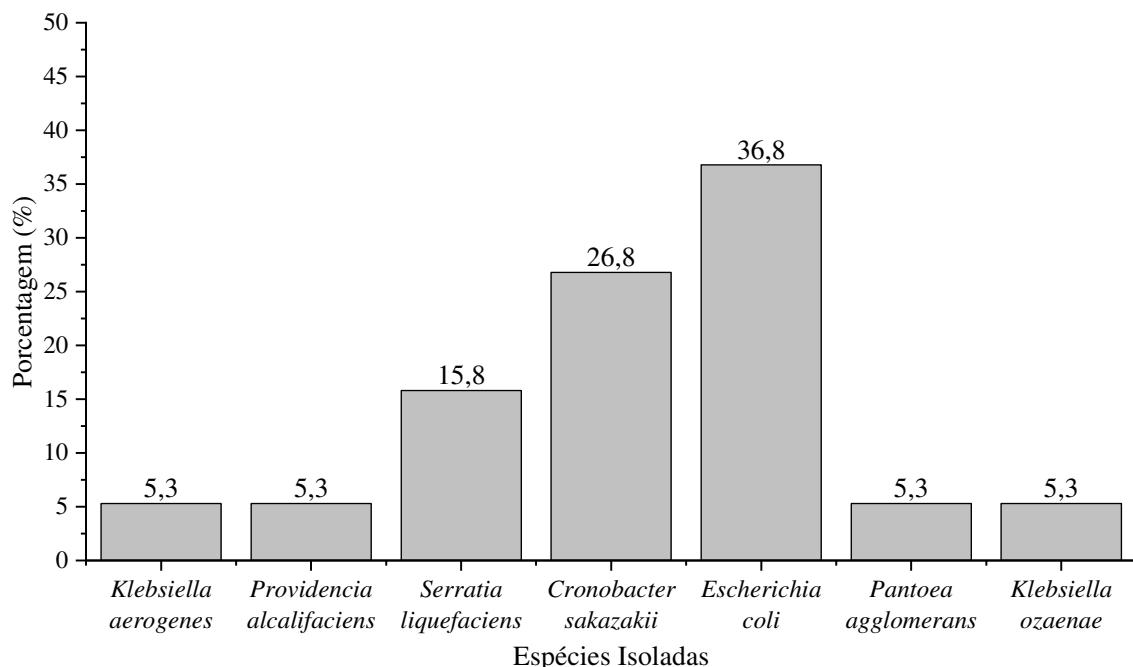
Em aves, Otutumi *et al* (2010) avaliaram a contagem de *Lactobacillus* spp. do intestino delgado de codornas de corte e verificaram maior contagem que os encontrados no presente trabalho, variando entre  $15.93 \times 10^4$  e  $333.19 \times 10^4$  UFC/g para animais de sete e 14 dias de idade.

Em relação à contagem de enterobactérias, verificou-se que para o estômago os valores variaram entre  $7 \times 10^2$  a  $2 \times 10^4$  UFC/mL (média de  $7.7 \times 10^4$  UFC/mL). Em contrapartida a contagem de enterobactérias do intestino delgado variou entre  $3.9 \times 10^3$  e  $2.7 \times 10^5$  UFC/g (média de  $1.6 \times 10^5$  UFC/mL). Em um estudo semelhante realizado por Daniel *et al* (2013) avaliando o estômago e intestino de morcegos frugívoros da espécie *Cynopterus brachyotis brachyotis* verificou-se valores variando entre  $3.06 \times 10^{10}$  e  $6.10 \times 10^{15}$  UFC/mL para o conteúdo estomacal e  $1.92 \times 10^{10}$  e  $6.10 \times 10^{15}$  UFC/mL para o conteúdo intestinal, o que pode estar relacionado as diferentes espécies de morcegos utilizados assim como a metodologia aplicada.

Já em relação ao estudo realizado por Malinčiová *et al* (2017), avaliando amostras obtidas da suspensão de guano de morcegos insetívoros da espécie *Rhinolophus euryale* durante seu período de hibernação, os autores encontraram uma contagem superior de enterobactérias variando entre  $1.03 \times 10^9$  a  $5.45 \times 10^9$  UFC/g. Essa diferença pode estar relacionada às diferenças no tipo de material colhido.

Foram isoladas sete diferentes espécies de enterobactérias, independente do segmento, sendo as mais frequentes *Escherichia coli* (36.8%), *Cronobacter sakasakii* (26.3%) e *Serratia liquefaciens* (15.8%) (Gráfico 1). Em trabalho realizado por Leigue dos Santos *et al* (2014) em isolados de enterobactérias do globo ocular de morcegos da espécie *Desmodus rotundus*, *Diameus youngi* e *Artibeus lituratus* foram isolados diferentes enterobactérias incluindo espécies como *Shigella* sp., *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Flavobacterium odoratum*, demonstrando que as espécies isoladas variam de acordo como o segmento de origem.

Gráfico 1 – Bactérias isoladas de ambos os segmentos (estômago e intestino delgado) de morcegos insetívoros da espécie *Molossus rufus* oriundos da microrregião de Cianorte, Noroeste do Paraná, 2018.

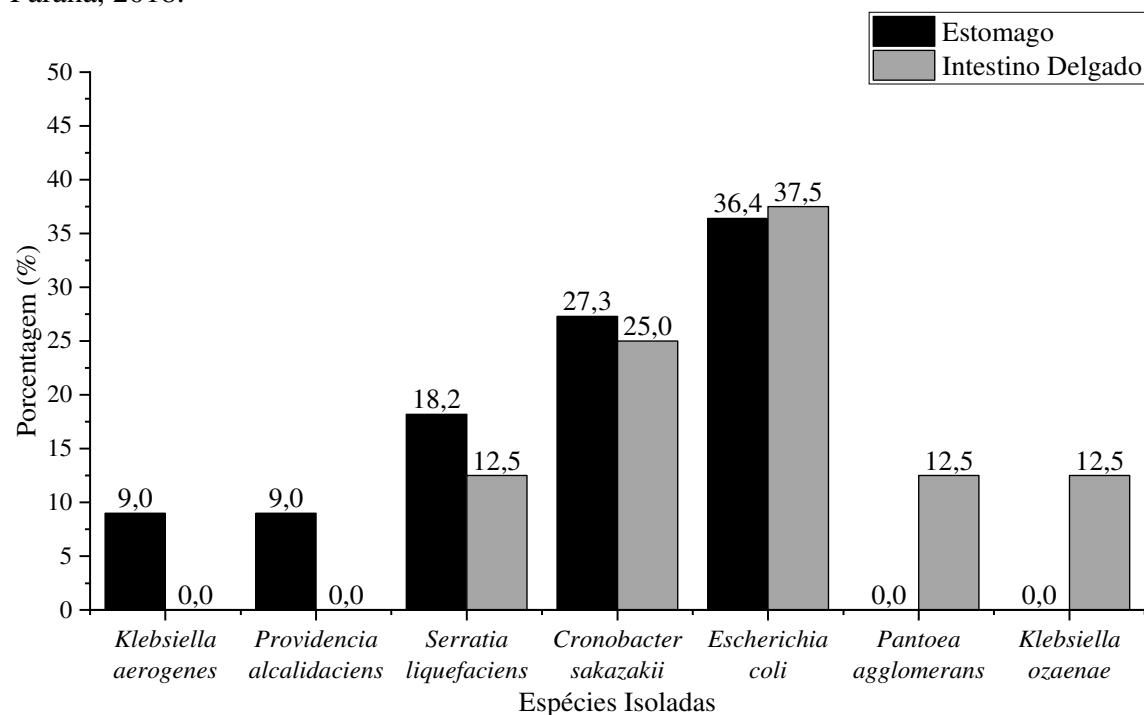


Fonte: Dados da Pesquisa.

Em relação ao segmento, verificou-se que a *Escherichia coli* representou 37.5% dos isolados do intestino delgado, enquanto *C. sakazakii* (27.3%) e *S. liquefaciens* (18.2%) apresentaram maior percentual no estômago (Gráfico 2).

A *E. coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa, quando apresenta perfil patogênico, é responsável por uma grande variedade de infecções nosocomiais dentre elas podemos citar as *E. coli* que está entre as principais causas de infecções do trato urinário em humanos e a segunda mais comum causa de meningite neonatal, não obstante este fator de patogenicidade faz com que esta enterobactéria seja muito importante para medicina humana e animal de forma que o aumento da resistência da mesma causa inúmeros casos de hospitalização e mortes (POOLMAN, J. T.; WACKER).

Gráfico 2 – Percentual de enterobactérias isoladas de amostras de estômago e intestino delgado de morcegos insetívoros da espécie *Molossus rufus* oriundos da microrregião de Cianorte, noroeste do Paraná, 2018.



Fonte: Dados da Pesquisa.

A bactéria *Cronobacter sakazakii* é uma bactéria oportunista de origem alimentar comumente relacionada à contaminação de fórmula infantil ou leite em pó e responsável pela enterocolite necrozante em recém nascidos (WENG *et al*, 2014), que por sua vez fez com que essa bactéria ganhasse importância na medicina humana e agentes reguladores responsáveis pelo controle da contaminação da mesma em indústrias alimentícias, no entanto, pouco se sabe sobre seu habitat natural e fatores de virulência que contribuem para suas propriedades de aderência e patogenicidade (YAN e GURTNER, 2014).

Tratando-se da enterobactéria *Serratia liquefaciens*, comumente a mesma pode ser relacionada a um grande número de infecções urinárias e respiratórias tornando-o um importante patógeno nosocomial (MARTINEZ e TADDEI, 2015). Além disso apesar da bactéria apresentar características patológicas, como apresentado por Anand e Sripathi (2004) as propriedades celulolítica e xilanolítica da *S. liquefaciens* auxilia no processo de digestão de morcegos frugívoros ao fazer a digestão de moléculas de celulose e xilana.

Em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos, verificou-se que 100% dos isolados, independente do segmento foram resistentes a PEN e sensíveis para os antimicrobianos TOB, GEN, IPM, CAZ, CRO, ATM e 5.26% (1/19) foi resistente à AMI, CTX e CTF (Tab 1.). Já no caso dos

antimicrobianos CFO, TET e CLO verificou-se perfil de resistência, respectivamente, de 31.58% (6/19), 21.05% (4/19) e 15.79% (3/19) (Tab 1.).

Tabela 1 – Bactérias isoladas de amostras de swab do conteúdo estomacal e tecido intestinal de morcegos insetívoros da espécie *Molossus rufus* e resultantes do padrão de resistência microbiana frente 19 antimicrobianos pelo método de disco-difusão.

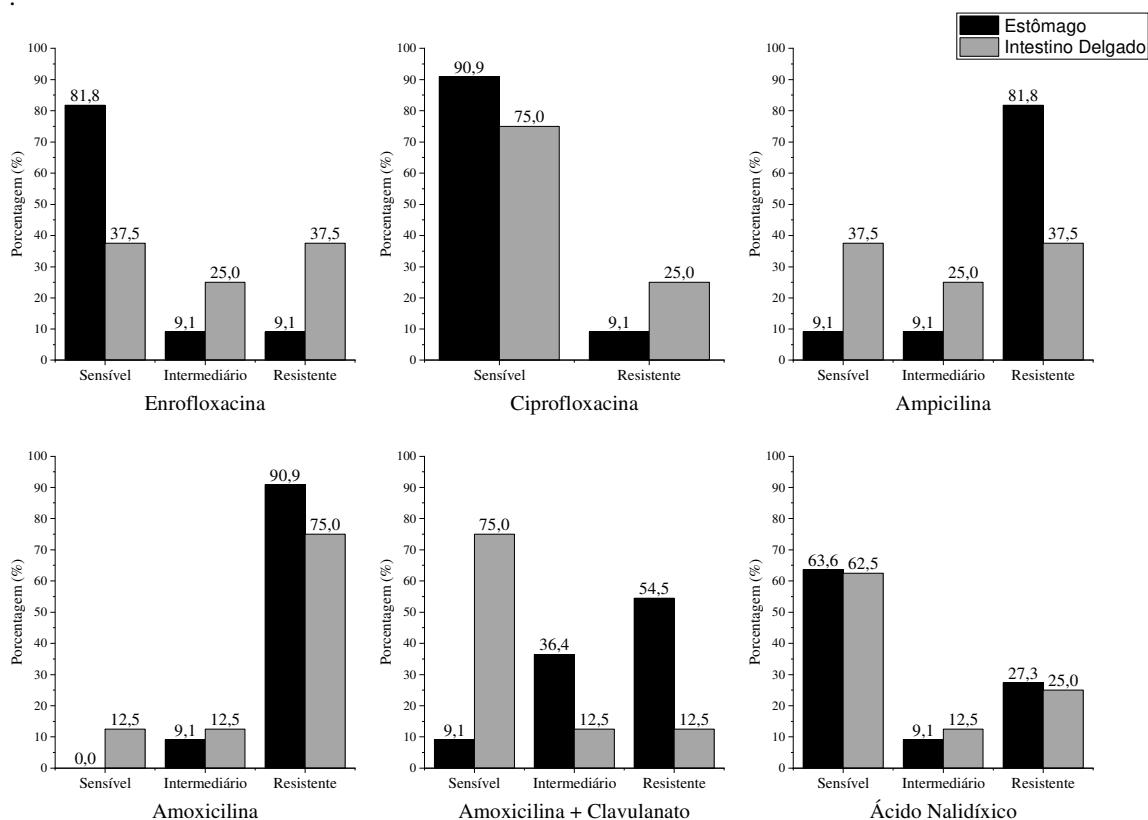
Cepa Isolada (nº de isolados)	Número de cepas resistentes aos antimicrobianos																		
	ENO	NAL	CIP	TOB	AMI	GEN	CAZ	CRO	CTX	CTF	CFO	IMP	AMP	AMO	AMC	PEN	ATM	TET	CLO
<i>K. aerogenes</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>P. alcalifaciens</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>S. liquefaciens</i> (3)	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	3	3	3	0	1	1
<i>C. sakazakii</i> (5)	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3	0	2	4	2	5	0	0	0
<i>E. coli</i> (7)	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	5	6	2	7	0	3	2
<i>P. agglomerans</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>K. ozaenae</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
TOTAL (%)	15,79	26,32	15,79	0	5,26	0	0	0	5,26	5,26	31,58	0	63,16	84,21	36,84	100	0	21,05	15,79

ENO = enrofloxacina, NAL = Ácido nalidíxico, CIP = ciprofloxacina, TOB = tobramicina, AMI = amicacina, GEN = gentamicina, CAZ = ceftazidina, CRO = cefatriaxona, CTX = cefotaxima, CTF = ceftiofur, CFO = cefoxitina, IMP = imipenem, AMP = ampicilina, AMO = amoxicilina, AMC = amoxicilina + clavulanato, PEN = penicilina, ATM = aztreonam, TET = tetraciclina, CLO = cloranfenicol.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Quando analisada a resistência antimicrobiana independente do micro-organismo isolado para os antimicrobianos ENO, AMO, CIP, AMC, AMP e NAL pode-se verificar que o perfil de resistência observado quanto aos isolados do estômago, foram mais resistentes frente a AMO (90.9%) e mais sensíveis frente à CIP (90.9%). Já em relação aos isolados do intestino delgado estes apresentaram maior resistência frente a AMO (75%) e maior sensibilidade a CIP (75%) e AMC (75%) (Gráfico3).

Gráfico 3 – Perfil de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina + clavulanato e ácido nalidíxico de enterobactérias isoladas do estômago e intestino delgado de morcegos da espécie *Molossus rufus* oriundos da microrregião de Cianorte, noroeste do Paraná, 2018



Fonte: Dados da Pesquisa.

O alto perfil de resistência observado aos antimicrobianos da classe das penicilinas tais como a AMO e PEN, era esperado, pois segundo Davies e Davies (2010) esta classe apresentou aproximadamente 1.000 casos de resistência até o ano de 2010, representando quase 10 vezes mais, que o valor encontrado na década de 1990. Além disso, os mesmos autores relatam que a transferência de gene de resistência entre bactérias de forma distinta da reprodução e transferência

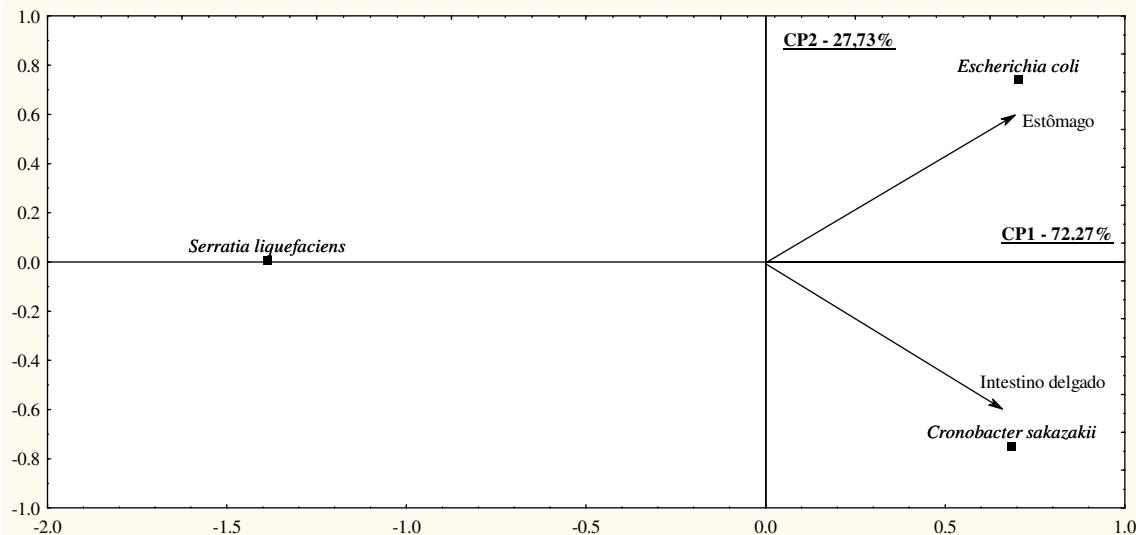
horizontal de gene, que teve um papel fundamental na transmissão da resistência aos antimicrobianos da classe das penicilinas principalmente quando relacionadas a bactérias entéricas.

No caso da sensibilidade aos antimicrobianos da classe das quinolonas, segundo Andriole (2005) o mesmo ainda apresenta eficácia quando usadas no tratamento de doenças infecciosas de origem gastrointestinal, urinária, óssea, dérmica e articular causadas por bactérias gram-negativas, assim como as do presente trabalho. Corroborando com os dados deste trabalho, Emmerson e Jones (2003), em seu trabalho de revisão, os autores determinaram que até então a CIP é a mais potente fluoroquinolona disponível contra bactérias gram-negativas.

Em relação às enterobactérias isoladas, com exceção da *Klebisella ozaenae*, resistente apenas a PEN, todas as bactérias foram resistentes a pelo menos dois dos quatro antimicrobianos da classe das penicilinas (AMP, AMO, AMC, PEN), sendo que o mesmo comportamento foi observado em relação a resistência a classe dos penicilinas por Sens Junior *et al* (2018) quando relacionado a atividade antimicrobiana de enterobactérias isoladas da região perianal e oral de morcegos da família Phyllostomidae e aos resultados obtidos por Cláudio *et al* (2018) quando analisados morcegos de três diferentes famílias, incluindo a dos Molossideos, e oriundos de cinco diferentes hábitos alimentares.

Os resultados da análise de componentes principais para os antimicrobianos da classe das penicilinas em relação aos três micro-organismos (*S. liquefaciens*, *C. sakasakii* e *E. coli*) isolados em ambos os segmentos, demonstrou que a bactéria *S. liquefaciens* apresenta comportamento similar em relação à resistência para ambos os segmentos, estômago e intestino delgado. A *E. coli* e o *C. sakasakii* apresentaram dissimilaridade, com a *E. coli* apresentando maior média para o estômago (média tamanho halo 5.19mm) e *C. sakasakii* maior média para o intestino delgado (média tamanho halo 15.00mm) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Biplot CP1 x CP2 das médias dos halos medidas para os antimicrobianos da classe das penicilinas (AMO, AMC, AMP e PEN) de três micro-organismos isolados (*Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Serratia liquefaciens*) do estômago e intestino delgado de morcegos capturados (n=5) na microrregião de Cianorte-PR



Fonte: Dados da Pesquisa.

Segundo as definições apresentadas por Sweeney *et al* (2018) em relação ao perfil MDR, no presente trabalho, apenas quatro isolados (4/19=21%) apresentaram este perfil sendo dois isolados de *S. liquefaciens* e um de *E. coli* provenientes do estômago e apenas um isolado de *E. coli* do intestino.

Considerando os dados encontrados o perfil de multirresistência apresentado pode estar relacionado à coexistência entre morcegos e humanos, ou de animais tanto domésticos como de criação que comumente podem compartilhar de um ambiente ou alimento contaminado, não obstante como apresentado por Laxminarayan *et al* (2013) o uso de sólidos biológicos e estrume em áreas agriculturáveis podem conter antimicrobianos e bactérias resistentes, que por sua vez através do escoamento da terra fertilizada ou de água contaminada podem afetar diretamente a propagação da multirresistência bacteriana.

Ao longo dos anos, o estudo dos mecanismos de propagação e patogenia de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem sido de vital importância para a criação e implementação de políticas públicas referentes a saúde única à nível mundial. Segundo Laxminarayan *et al* (2013), a resistência bacteriana está diretamente relacionada com a falta de conhecimento de quem a usa ou onde se aplica, sendo que parte dos consumidores não compreendem as consequências de sua resistência.

Cabe salientar que com a expansão agrícola e agropecuária estes animais passaram a estar sujeitos à perda de seu habitat e recursos naturais, o que aumentou a chance de contato direto ou indireto com o homem (RAMBALDI e SUÁREZ-DE-OLIVEIRA, 2003). Além disso, a área de estudo em questão se encontra em uma das áreas de amortecimento do parque Cinturão Verde de

Cianorte, podendo ligar a presença dos animais capturados ao corredor ecológico formado na região.

Desta forma o morcego da espécie *M. rufus* ao compartilhar o mesmo ambiente com humanos, como observado neste trabalho, evidencia que estes animais são suscetíveis à contaminação por enterobactérias multirresistentes vistas em humanos e que após seu contato com estas bactérias estes animais têm sua importância no papel de dispersor de zoonoses, visto que estes possuem comportamento de formação de colônia mista (2002) e de voo livre que garante deslocamento rápido através de grandes distâncias potencializando seu fator de dispersão (2011).

Não obstante, apesar de algumas bactérias apresentarem resistência ainda não está claro como a presença delas afeta a saúde dos morcegos. No entanto, como já descrito por O’Shea *et al* (2014) é possível que durante o voo o aumento do metabolismo e temperatura corporal semelhante a resposta febril observada em outros mamíferos colaborando para uma força seletiva para coexistência de micro-organismos em seu corpo.

No presente trabalho foi avaliada apenas uma espécie de morcego de hábito insetívoro, no entanto, este estudo apresenta vital importância para o conhecimento de sua microbiota e sua resistência aos antimicrobianos de importância na clínica humana e veterinária, agregando assim conhecimento para a pesquisa com dados ainda não registrados sobre a espécie *M. rufus*.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A multirresistência bacteriana foi identificada nos morcegos da espécie *M. rufus* da microrregião de Cianorte, noroeste do Paraná, demonstrando sua relevância em relação à saúde única, visto que os animais foram capturados em uma área ocupada por humanos.

A contagem de *Lactobacillus* spp. do intestino delgado foi superior à contagem de enterobactérias, demonstrando sua importância, por sua atuação como microbiota benéfica.

Apesar de morcegos da espécie *M. rufus* não entrarem em contato direto com humanos a propagação de patógenos resistentes, antes vistos somente em humanos, está diretamente relacionado ao compartilhamento de ambientes a que estes estão sujeitos.

## REFERÊNCIAS

- ABEDI-LARTEY, M. et al. Long-distance seed dispersal by straw-coloured fruit bats varies by season and landscape. **Global Ecology and Conservation**, v. 7, p. 12-24, 2016.
- ALTRINGHAM, J. D. Flight. In ALTRINGHAM, J. D. **Bats: from evolution to conservation**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, p. 37-60, 2011.
- ANAND, A. A. P.; SRIPATHI, K. Digestion of cellulose and xylan by symbiotic bacteria in the intestine of the Indian flying fox (*Pteropus giganteus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 139, n. 1, p. 65-69, 2004.
- ANDRIOLE, V. T. The Quinolones: Past, Present, and Future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. suppl\_2, p. S113-S119, 2005.
- BRASIL (2012) Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de Manejo da Reserva Biológica das Perobas. Brasília.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 62, agosto de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2003:1-14. Seção 1.
- CARROLL, D. Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. **Zoonoses and public health**, v. 62, n. 7, p. 534-542, 2015.
- CLÁUDIO, V. C. et al. Bacteria richness and antibiotic-resistance in bats from a protected area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0203411, 2018.
- CLSI. CLSI supplement M100. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.
- DALE, N. Probióticos para aves. **Avicultura Professional**, v. 10, p. 88-89, 1992.
- DANIEL, D. S. et al. Isolation and identification of gastrointestinal microbiota from the short-nosed fruit bat *Cynopterus brachyotis brachyotis*. **Microbiological research**, v. 168, n. 8, p. 485-496, 2013.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.
- EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. suppl\_1, p. 13-20, 2003.
- FISCHER, K. et al. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 37, p. 108-116, 2016.
- GROMAN, R. P. Gram-negative infections. In ALDRICH, J. **Small animal critical care medicine**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p. 493-499, 2014.

HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados.** Tradução Adonai Schlup Sant'Anna e Anselmo Chaves Neto, 5. ed. Porto Alegre: Bookman. 2005. 593 p.

HUSSAIN, T. An introduction to the Serotypes, Pathotypes and Phylotypes of *Escherichia coli*. **International Journal of Microbiology and Allied Sciences**, v. 2, p. 9-16, 2015.

IAPAR (2015) Cartas Climáticas do Paraná. Instituto Agronômico do Paraná, Curitiba. <https://goo.gl/ocyHUX>. Acessado em 18 de novembro de 2018.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance: the need for global solutions. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEIGUE DOS SANTOS, L. et al. Bacterial microbiota of the ocular surface of captive and free-ranging microbats: *Desmodus rotundus*, *Diameus youngi* and *Artibeus lituratus*. **Veterinary ophthalmology**, v. 17, n. 3, p. 157-161, 2014.

MACKENSTEDT, U.; JENKINS, D.; ROMIG, T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 1, p. 71-79, 2015.

MALINČIOVÁ, L. et al. The dynamics of Mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale*, Chiroptera) gut microflora during hibernation. **Acta Chiropterologica**, v. 19, n. 1, p. 211-218, 2017.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Enterobacteriaceae. In TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 293–302, 2015.

MOITA-NETO, J. M.; MOITA, G. C. (1998) An introduction analysis exploratory multivariate date. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MÜHLDORFER, K. Bats and bacterial pathogens: a review. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 1, p. 93-103, 2013.

O'SHEA, T. J. et al. Bat flight and zoonotic viruses. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 741, 2014.

ORIGIN(PRO), 9.5 (2018). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

OTUTUMI, L. K. et al. Diferentes vias de administração de probiótico sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a população microbiana do intestino delgado de codornas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 158-164, 2010

POOLMAN, J. T.; Wacker, M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 1, p. 6-13, 2015.

PRINGSULAKA, O. et al. In vitro screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics. **Livestock Science**, v. 174, p. 66-73, 2015.

PUIG-MONTSERRAT, X. et al. Pest control service provided by bats in Mediterranean rice paddies: linking agroecosystems structure to ecological functions. **Mammalian Biology**, v. 80, n. 3, p. 237-245, 2015.

QUINN, P. J. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe. 1994.

RAMBALDI, D. M.; SUÁREZ DE OLIVEIRA, D. M. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília, DF: MMA/SBF. (Biodiversidade 6). 2003.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P. Morcegos da Bacia do rio Tibagi. In MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A Bacia do rio Tibagi**. Londrina, p. 251-270, 2002.

RODRÍGUEZ-AGUILAR, G. et al. Influence of urbanization on the occurrence and activity of aerial insectivorous bats. **Urban ecosystems**, v. 20, n. 2, p. 477-488, 2017.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; HUME, C. W. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen. London: Methuen, 1959.

SENS-JUNIOR, H. et al. Bacterial resistance in bats from the Phyllostomidae family and its relationship with unique health. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1207-1216, 2018.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p 312-529, 2005.

STATSOFT INC. (2018) *Statistica for Windows* (Computer Program Manual). <http://www.statsoft.com/> Acessado em 4 de novembro de 2018.

SWEENEY, M. T. et al. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1460-1463, 2018.

VIEIRA, C. O. C. Ensaio monográfico sobre os quirópteros do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, vol. 3, n. 8, p. 219-471, 1942.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Revista da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São José do Rio Preto, Boletim de Ciências**, vol. 1, p. 1-72, 1973.

WENG, M. et al. Conditioned medium from *Bifidobacterium infantis* protects against *Cronobacter sakazakii* - induced intestinal inflammation in newborn mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 306, n. 9, p. 779-787, 2014.

YAN, X.; GURTNER, J. *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. In BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Londres: Elsevier Ltd, Academic Press, p. 528-532, 2014.