






Resistência a antimicrobianos e tolerância ao arsênio em *Enterococcus* spp. isolados de *Leopardus geoffroyi* de vida livre em Candiota, no bioma Pampa, Brasil: sentinelas da poluição ambiental

[Antimicrobial resistance and arsenic tolerance in *Enterococcus* spp. isolated from free-ranging *Leopardus geoffroyi* in Candiota, Pampa Biome, Brazil: sentinel indicators of environmental pollution]

Amanda Ladeira Toigo¹ , Manuela Gamarra Cassol¹ , Ana Paula Neuschrank Albano² , Marina Ochoa Favarini^{1,3} , Felipe Bortolotto Peters^{1,3} , Lina Marcela Violet-Lozano¹ , Janira Prichula⁴ , Ana Paula Guedes Frazzon*¹ 

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil 

2 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil 

3 Instituto Pró-Carnívoros (IPC), Atibaia, São Paulo, Brasil 

4 Mass Eye and Ear and Harvard Medical School, Boston, MA, USA 

*autor correspondente: ana.frazzon@ufrgs.br

Recebido: 25 de setembro de 2025. Aceito: 24 de fevereiro de 2026. Publicado: 10 de abril de 2026.

Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: O bioma Pampa abriga uma notável diversidade de espécies endêmicas, mas vem sofrendo intensos impactos decorrentes de atividades antrópicas, que ameaçam a conservação de espécies silvestres, tais como o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*). Nesse contexto, este estudo avaliou a resistência a antimicrobianos e a tolerância a metais pesados em enterococos isolados das cavidades oral e retal de 14 gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre da região do Seival/ Candiota, no bioma Pampa, como bioindicadores da qualidade ambiental. O isolamento foi realizado em meios seletivos, a identificação das espécies foi feita por MALDI-TOF, e a suscetibilidade foi determinada pelo método de disco-difusão frente a 12 antimicrobianos de uso clínico e veterinário. Genes de resistência a antimicrobianos (*msrC*, *ermB*, *tetM* e *tetL*) e de tolerância a metais pesados (*arsA_I*, *arsA_II* e *tcrB*) foram investigados por PCR. Um total de 111 isolados de enterococos foi recuperado. *Enterococcus faecium* (37,8 %) e *Enterococcus faecalis* (29,7 %) predominaram, apresentando distribuição distinta entre amostras orais e retais. No geral, 74,8 % dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, principalmente à rifampicina (41,4 %), à eritromicina (34,2 %) e à ciprofloxacina (26,1 %). Não foi detectada resistência à gentamicina nem à vancomicina. A resistência a múltiplos antimicrobianos foi observada em 17 isolados (20,5 %). Determinantes de resistência (*msrC*, *ermB*, *tetM* e *tetL*) e o gene de tolerância ao arsênio (*arsA_I*) foram identificados, enquanto *arsA_II* e *tcrB* não foram detectados. Em conclusão, a presença de enterococos resistentes a múltiplos antimicrobianos e tolerantes ao arsênio em gatos-do-mato-grande de vida livre reforça seu uso como bioindicadores da qualidade ambiental e evidencia o impacto das atividades antrópicas na saúde animal.



Palavras-chave: Impactos antropogênicos; bioindicadores ambientais; conservação da vida silvestre; saúde única.

Abstract: The Pampa Biome harbors a high diversity of endemic species but has experienced substantial pressure from anthropogenic activities that threaten wildlife conservation, including Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*). Within this context, this study evaluated antimicrobial-resistant and heavy-metal-tolerant enterococci isolated from oral and rectal cavities of 14 free-ranging Geoffroy's cats (*L. geoffroyi*) from Seival–Candiota region in Brazilian Pampa as indicators of environmental quality. Isolation was conducted on selective media, species identification was performed using MALDI-TOF mass spectrometry, and antimicrobial susceptibility was assessed by disk diffusion against 12 antimicrobials used in human and veterinary medicine. Antimicrobial resistance genes (*msrC*, *ermB*, *tetM*, and *tetL*) and heavy-metal tolerance genes (*arsA_I*, *arsA_II*, and *trcB*) were investigated by PCR. A total of 111 enterococcal isolates were recovered. *Enterococcus faecium* (37.8 %) and *Enterococcus faecalis* (29.7 %) predominated, showing distinct distribution between oral and rectal samples. Overall, 74.8 % of isolates were resistant to at least one antimicrobial, mainly rifampicin (41.4 %), erythromycin (34.2 %), and ciprofloxacin (26.1 %). No resistance to gentamicin or vancomycin was detected. Multidrug resistance occurred in 17 isolates (20.5 %). Resistance determinants (*msrC*, *ermB*, *tetM*, and *tetL*) and arsenic tolerance gene *arsA_I* were identified, whereas *arsA_II* and *trcB* were not detected. Findings demonstrate the presence of multidrug-resistant and arsenic-tolerant enterococci in free-ranging Geoffroy's cats, supporting their role as sentinel species of environmental quality and evidencing the influence of anthropogenic activities on animal health.

Keywords: Anthropogenic impact; environmental bioindicators; wildlife conservation; one health.

1. Introdução

O bioma Pampa representa um valioso patrimônio natural e cultural, devido à sua biodiversidade singular e aos serviços ecossistêmicos que sustenta. Com uma área de aproximadamente 700.000 km², essa formação campestre se estende pelo sul do Brasil, Argentina e Uruguai ⁽¹⁾. No Brasil, o Pampa ocorre exclusivamente no estado do Rio Grande do Sul, abrangendo cerca de 193.836 km², equivalente a 69 % do território gaúcho e a 2.3 % do território nacional ⁽²⁾. O Pampa tem grande importância ambiental, pois abriga uma elevada diversidade de espécies endêmicas de animais, incluindo mais de 500 espécies de aves e mais de 100 de mamíferos terrestres ⁽³⁾. Apesar de sua importância para a conservação da biodiversidade brasileira, o bioma Pampa vem sofrendo perda intensa de vegetação nativa ao longo dos anos. Estimativas apontam que a cobertura original, que correspondia a 41,32 % em 2002, reduziu-se para 36,03 % em 2008 ⁽⁴⁾. O processo de degradação acelerado, impulsionado principalmente pela expansão agrícola (soja e arroz) e industrial (mineração e celulose), tem resultado em perdas significativas da fauna e da flora originais.

Diante desse cenário, os impactos das atividades antrópicas sobre o ecossistema do Pampa vêm sendo amplamente discutidos e monitorados ⁽⁵⁾, reforçando a necessidade de iniciativas voltadas à conservação. Nesse contexto, o *Projeto Felinos do Pampa* tem como foco principal avaliar os efeitos das atividades humanas sobre os felinos silvestres, integrando-se ao *Geoffroy's Cat Working Group* - uma rede internacional dedicada à pesquisa e conservação ⁽⁶⁾. O projeto concentra seus esforços no Pampa brasileiro, tendo o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) como uma das espécies-bandeira de suas ações. Embora classificado como "Pouco Preocupante" em escala global ⁽⁷⁾, o gato-do-mato-grande encontra-se em situação ameaçada

no Brasil, considerado como “Vulnerável” tanto em nível nacional ⁽⁸⁾ quanto regional ⁽⁹⁾. Entre as principais ameaças destacam-se a fragmentação de habitats, que expõe a espécie a ambientes cada vez mais antropizados e aumenta os riscos de atropelamentos, a caça retaliatória e a transmissão de doenças provenientes de animais domésticos ^(10–12).

Além das ameaças diretas à conservação, a detecção de impactos ambientais sutis na microbiota do hospedeiro representa uma dimensão crítica adicional. Nesse sentido, as comunidades microbianas intestinais podem refletir o estado fisiológico do hospedeiro e as pressões ambientais, funcionando assim como indicadores de distúrbios nos ecossistemas e da influência antrópica ^(13,14). Entre os microrganismos utilizados como bioindicadores, o gênero *Enterococcus* tem recebido atenção especial ^(15–21). Espécies de *Enterococcus* são consideradas comensais do trato gastrointestinal, podendo ser encontrados no trato geniturinário, além da cavidade oral de humanos e animais, podendo também ser encontradas em ambientes externos, como solo, água e alimentos ^(22–28). De acordo com evidências moleculares e filogenéticas, o gênero inclui mais de 90 espécies, entre as quais *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii* são as mais frequentemente encontradas no trato gastrointestinal de animais ⁽²⁹⁾. Nos últimos anos, tem-se dado atenção crescente à caracterização da diversidade de enterococos, dos perfis de resistência a antimicrobianos e da tolerância a metais pesados em isolados obtidos de animais silvestres. Esses estudos têm destacado o potencial dos enterococos como organismos sentinela para o monitoramento da saúde animal e dos ecossistemas em ambientes potencialmente contaminados ^(23–28, 30–33).

Apesar da importância ecológica do Pampa e da vulnerabilidade de espécies como o *L. geoffroyi*, ainda são escassos estudos que caracterizem sua microbiota intestinal e oral sob a perspectiva de bioindicadores ambientais. Investigar essa interface é essencial para compreender os efeitos das pressões antrópicas e contribuir para estratégias de conservação alinhadas à Saúde Única. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a suscetibilidade a antimicrobianos e tolerância a metais pesados de espécies de *Enterococcus* isoladas das cavidades oral e retal de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre capturados na região de Seival em Candiota, do bioma Pampa. Por fim, busca também explorar sua aplicabilidade como bioindicadores da qualidade ambiental em habitats naturais ocupados por esta espécie.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo – Pampa brasileiro: município de Candiota

O município de Candiota está localizado na região sul do estado do Rio Grande do Sul, a aproximadamente 387 km da capital, Porto Alegre. Com uma área total de 933,628 km² e população estimada de 10.710 habitantes, apresenta uma densidade demográfica de 11,47 hab/km² ⁽³⁴⁾. Deste total, cerca de 73.234,754 hectares são destinados a atividades agropecuárias, correspondendo a 78,4 % do território municipal. A economia local é fortemente influenciada pela geração de energia termelétrica, em razão da abundância de carvão mineral em seu subsolo. Atualmente, Candiota abriga três grandes empresas mineradoras e termelétricas, além de fábricas de cimento vinculadas a um dos maiores conglomerados do setor a nível global, posicionando o município como um polo estratégico no cenário energético nacional. De forma complementar, destacam-se a pecuária e a agricultura, sobretudo pela produção de soja e arroz ⁽³⁵⁾.

2.2 Amostragem e coleta de material biológico de *L. geoffroyi*

Quatorze gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre foram capturados entre junho de 2022 e fevereiro de 2023, na região do Seival, distrito do município de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela Suplementar 1). As capturas integraram o *Projeto Felinos do Pampa* e seguiram os protocolos metodológicos descritos por Tirelli et al ⁽¹²⁾, além das diretrizes para manejo de mamíferos silvestres propostas por Sikes et al ⁽³⁶⁾. As capturas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio da licença ICMBIO/SISBIO-81869-2, com finalidade estritamente científica. Todos os procedimentos envolvendo animais foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), conforme o protocolo CEUA/UFRGS-42867.

Suabes das cavidades oral e retal foram coletadas de cada animal, acondicionados em meio de transporte *Stuart* e transportados sob refrigeração (4 °C) até o Laboratório de Microbiologia de Animais Silvestres do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, onde foram mantidos refrigerados até a realização das análises microbiológicas.

2.3 Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias do gênero *Enterococcus*

Para a seleção de bactérias do gênero *Enterococcus*, os suabes da cavidade oral (CO) e retal (CR) foram imersos em tubos contendo 3 mL de caldo Azida Dextrose (*Azide Dextrose Broth*, Himedia®, Índia) e incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada decimal em solução salina estéril a 0,85 % de NaCl. Cem microlitros das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram semeados em placas de ágar Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*, BHI) suplementado com 4,5 % de NaCl, pelo método de espalhamento em superfície, seguidos de incubação a 37 °C por 24 h. Após a incubação, seis unidades formadoras de colônia (UFC) foram selecionadas aleatoriamente, repicadas em ágar Bile Esculina e incubadas sob as mesmas condições. As colônias que apresentaram escurecimento foram então repicadas em ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h para análises subsequentes. As culturas selecionadas foram submetidas a testes fenotípicos morfofisiológicos, incluindo coloração de Gram e teste da atividade da enzima catalase, para identificação presuntiva do gênero *Enterococcus*. Os isolados com características fenotípicas compatíveis com o gênero foram armazenados em criotubos contendo 1 mL de meio de conservação composto por 10 % de leite desnatado e 10 % de glicerol a -20 °C, para posterior identificação molecular em nível de espécie ^(24, 27).

2.4 Identificação das espécies de *Enterococcus*

Para identificação de espécies, a técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – TOF/Bruker Daltonik GmbH) foi utilizada segundo Sauget et al ⁽³⁷⁾. Para diferenciação de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, espécies que exibem resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina, foram realizados dois testes bioquímicos conforme relatado por Cartwright et al ⁽³⁸⁾. Para o teste de produção de pigmento, uma colônia de cada cultura foi cuidadosamente retirada com um cotonete estéril e observada quanto à coloração amarela, indicativo da espécie *E. casseliflavus*. Além disso, foi realizado o teste da motilidade, por meio da introdução de agulha com colônia bacteriana, em coluna reta até a profundidade de 2/3 em meio de cultura semissólida de ágar BHI e, posteriormente, incubação por 24 h a 37°C. Nesse teste, *E. casseliflavus* apresenta resultado positivo e *E. munditti* negativo, o que permite classificar corretamente cada espécie.

2.5 Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *Enterococcus* também foram submetidos à determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por meio do teste de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton, conforme o método padronizado de Kirby-Bauer et al.⁽³⁹⁾ Para cada amostra bacteriana, um inóculo foi preparado em 5 mL de solução salina a 0,85 % de NaCl, com posterior ajuste da turbidez para o padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As suspensões foram semeadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar, Acumedia®, Neogen, Michigan), utilizando o método de espalhamento em superfície com auxílio de swab estéril. Em seguida, os discos impregnados com os antimicrobianos foram aplicados sobre o meio, e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros e interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁽⁴⁰⁾, sendo os isolados classificados como sensíveis (S), sensibilidade intermediária (I) ou resistentes (R). Os seguintes antimicrobianos foram testados: ampicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), linezolida (10 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg), conforme recomendações do CLSI/2021.

Cepas intermediárias e resistentes foram agrupadas em uma única categoria como cepas resistentes. As cepas foram classificadas como apresentando fenótipo de resistência simples (SR), dupla (DR) ou multirresistente (MDR) se apresentassem resistência a uma, duas ou três ou mais classes de antimicrobianos, respectivamente⁽⁴¹⁾.

2.6 Extração do DNA genômico e detecção dos genes relacionados à resistência aos antimicrobianos e aos metais pesados

A extração do DNA genômico dos isolados de *Enterococcus* foi realizada por lise química, segundo o protocolo descrito por Bell et al.⁽⁴²⁾. O DNA obtido foi armazenado a -20 °C até sua utilização nas reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), destinadas à detecção dos genes relacionados à resistência a antimicrobianos e metais pesados. As reações de PCR foram conduzidas com base nos parâmetros previamente padronizados, conforme detalhado na Tabela 1.

A detecção dos genes de resistência aos antibióticos foi realizada em todas as amostras que apresentaram fenótipo resistente à eritromicina e à tetraciclina. Esses antimicrobianos são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária, e os mecanismos de resistência associados a esses genes em enterococos são frequentemente relacionados com elementos genéticos móveis. Nessas cepas, foi realizada a PCR para a detecção dos genes de resistência à eritromicina *ermB* e *msrC* e assim como dos genes de resistência à tetraciclina *tetL* e *tetM*. As cepas de *Enterococcus* spp. 485 e *E. faecium* CM5-2 foram utilizadas como controles positivos para *ermB* e *msrC*, respectivamente. Para o controle positivo dos genes *tetL* e *tetM* da tetraciclina foram usadas as cepas de *E. faecium* CM11-3 e CM5-6.

Para investigar os genes associados aos metais pesados, todas as cepas isoladas foram testadas para os genes *arsA_I* e *arsA_II*, que conferem resistência ao arsênio, e para o gene *tcrB*, que confere resistência ao cobre. Como controle positivo foi utilizada a cepa *E. faecalis* ATCC 29212 para *arsA_I* e *tcrB*, enquanto a cepa *L. monocytogenes* ALD11249.1 para a detecção do gene *arsA_II*⁽²¹⁾.

Tabela 1. Os oligonucleotídeos iniciadores e os parâmetros de PCR empregados na detecção de genes associados ao arsênio, cobre, eritromicina e tetraciclina em *Enterococcus* spp.

Oligonucleotídeos	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5'-3')	MM ¹ (bp)	TA ²	Referência
Arsênio				
arsA_I_F	GGCAAT YGCCGCAGCAAT TGA	643	58°C	Rebelo et al ⁽²¹⁾
arsA_I_R	TCCAGAAGCAGAGAAGT			
arsA_II_F	GTAGAAGGT TTAGTTGTCGCC ATGTAAG	728	62°C	Rebelo et al ⁽²¹⁾
arsA_II_R	TGRGGAAAT TCT TTT GGT			
Cobre				
tcrB_F	CATCACGGTAGCTTTAAGGAGATTTTC	663	56°C	Hasman et al ⁽⁴³⁾
tcrB_R	ATAGAGGACTCCGCCACCATTG			
Eritromicina				
ermB_F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	574	52°C	Sutcliffe et al ⁽⁴⁴⁾
ermB_R	AGTAAC GGTACTTAAATTGTTTAC			
msrC_F	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG	343	52°C	Werner et al ⁽⁴⁵⁾
msrC_R	GTAACAAAATCGTTCCC G			
Tetraciclina				
tetL_F	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC	625	58°C	Frazzon et al ⁽⁴⁶⁾
tetL_R	TGTAACCTCCGATGTTTAACACG			
tetM_F	GTAAATAGTGTCTTGGAG	657	52°C	Aerestrup et al ⁽⁴⁷⁾
tetM_R	CTAAGATATGGCTCTAACAA			

1: MM: massa molecular do fragmento em pares de bases; 2: TA: temperatura de anelamento.

3. Resultados e discussão

Visando avaliar o potencial efeito das atividades antrópicas sobre populações de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa, enterococos isolados das cavidades oral e retal de *L. geoffroyi* foram utilizados como bioindicadores.

3.1 Distribuição das espécies de *Enterococcus* na cavidade oral e retal de *L. geoffroyi*

No presente estudo, um total de 111 cepas de *Enterococcus* spp. foram isoladas de amostras das cavidades orais (CO) e retais (CR) de 14 gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre da região do Seival, entre junho de 2022 e fevereiro de 2023. De cada amostra, foram selecionadas, em média, três a quatro colônias com morfologia compatível com o gênero. Do total de isolados, 50 (45 %) foram obtidos de suabes orais e 61 (55 %) de suabes retais (Tabela Suplementar 2).

Entre as espécies identificadas, *E. faecium* (37,8 %; n = 42) e *E. faecalis* (29,7 %; n = 33) foram as mais frequentes, seguidas por *E. hirae* (13,5 %; n = 15), *E. casseliflavus* (9,9 %; n = 11), *E. durans* (7,2 %; n = 8) e *E. mundtii* (1,8 %; n = 2). A distribuição das espécies variou de acordo com o sítio anatômico de amostragem. As amostras orais foram compostas principalmente por *E. faecalis* e *E. faecium*, enquanto as amostras retais apresentaram maior diversidade de espécies, incluindo maior frequência de *E. hirae* e detecção exclusiva de *E. mundtii* (Figura 1).

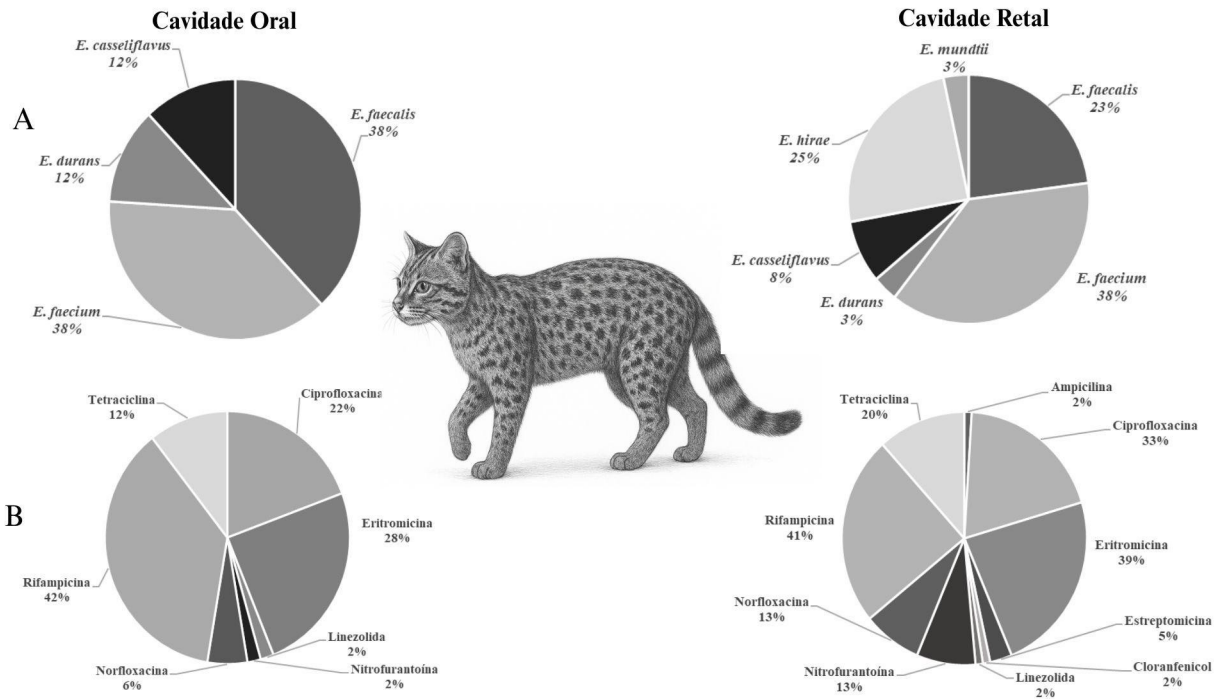


Figura 1. Distribuição das espécies de *Enterococcus* spp. (a) e perfil de resistência aos antimicrobianos (b) entre as amostras da cavidade oral e retal de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa, Brasil entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

As diferentes espécies de enterococos identificadas no estudo parecem refletir a dieta desse felino, a qual é composta, principalmente, por mamíferos e aves de pequeno porte (48-52). A elevada frequência de *E. faecalis* pode estar associada à ingestão de roedores, já que Lauková et al (53) relataram 70 % dessa espécie em intestinos de roedores selvagens. De forma semelhante, a ocorrência de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. durans* e *E. hirae* pode refletir o consumo de aves, já que essas espécies são comumente encontradas em aves silvestres (54) e frangos de corte (55). Assim, o perfil de enterococos observado nesse estudo sugere que a alimentação dos gatos-do-mato influencia significativamente a colonização de sua microbiota oral e intestinal.

3.2 Perfil de resistência das cepas de enterococos isoladas de *L. geoffroyi*

Dentre as 111 cepas analisadas quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados, 83 (74,8 %) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, conforme detalhado na Tabela 2. As maiores frequências de resistência foram observadas para rifampicina (41,4 %), eritromicina (34,2 %) e ciprofloxacina (26,1 %). Em menor proporção, houve resistência à tetraciclina (13,5 %), à norfloxacina (9,9 %), à nitrofurantoina (4,5 %), à estreptomicina (2,7 %), à linezolid (1,8 %), à ampicilina (0,9 %) e ao cloranfenicol (0,92 %). Nenhuma cepa apresentou suscetibilidade à gentamicina ou à vancomicina.

Tabela 2. Número (%) de espécies de enterococos resistentes aos antimicrobianos isolados da cavidade oral e retal de gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

	Número (%) de espécies de enterococos resistentes aos antimicrobianos						
	Espécies (n)						
	<i>E. faecium</i> (n=42)	<i>E. faecalis</i> (n=33)	<i>E. casseliflavus</i> (n=11)	<i>E. hirae</i> (n=15)	<i>E. durans</i> (n=8)	<i>E. mundtii</i> (n=2)	Total (n=111)
Antimicrobiano							
Ampicilina	0	0	0	0	1 (12,5)	0	1 (0,9)
Ciprofloxacina	22 (52,4)	1 (3,03)	1 (9,1)	2 (13,3)	3 (37,5)	0	29 (26,1)
Cloranfenicol	1 (2,3)	0	0	0	0	0	1 (0,9)
Eritromicina	17 (40,5)	12 (36,4)	4 (36,4)	2 (13,3)	2 (25)	1 (50)	38 (34,2)
Estreptomicina	2 (4,6)	0	0	0	1	0	3 (2,7)
Nitrofurantoína	1 (2,3)	0	0	1 (6,7)	3	0	5 (4,5)
Norfloxacina	9 (21,4)	0	0	1 (6,7)	1	0	11 (9,9)
Rifampicina	19 (45,2)	13 (39,4)	6 (54,5)	4 (26,6)	4 (50)	0	46 (41,4)
Tetraciclina	11 (26,1)	1 (3,0)	2 (18,2)	0	1 (12,5)	0	15 (13,5)
Linezolida	1 (2,3)	1 (3,0)	0	0	0	0	2 (1,18)

Os enterococos isolados da cavidade retal apresentaram frequência e complexidade de resistência mais elevadas em comparação com os isolados da cavidade oral. Nos isolados das amostras orais a rifampicina foi o antimicrobiano com maior frequência de resistência (42 %), seguida por eritromicina (28 %) e ciprofloxacina (22 %). Nos isolados retais o percentual de resistência foi maior para rifampicina (41 %), eritromicina (39 %) e ciprofloxacina (33 %). A tetraciclina apresentou resistência moderada em ambos os sítios, sendo mais frequente na cavidade retal (20 % versus 12 %). Resistência à norfloxacina, linezolida e nitrofurantoína foi relativamente baixa em ambos os grupos, embora ligeiramente mais elevada nos isolados retais (Figura 1b). Espécies como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* e *E. casseliflavus* contribuíram de forma diferenciada para esses perfis, evidenciando que a cavidade retal concentra enterococos com maior frequência de resistência e maior diversidade de padrões multirresistentes em comparação à cavidade oral (Tabelas Suplementares 3 e 4).

O resultado demonstra que os enterococos isolados da cavidade oral e retal de gatos-do-mato-grande de vida livre apresentaram resistência a antimicrobianos amplamente utilizados tanto na clínica humana quanto na medicina veterinária, com destaque para ciprofloxacina, eritromicina, rifampicina e tetraciclina⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. A presença de cepas resistentes em animais silvestres, que não recebem tratamentos antimicrobianos, sugere aquisição por dieta ou exposição a ambientes contaminados.

Dessa forma, a detecção de enterococos resistentes em amostras de gatos-do-mato-grande em vida livre provavelmente decorre do contato com atividades antrópicas em seus habitats. Os animais estudados são encontrados em áreas submetidas a esses tipos de atividades, incluindo a pecuária, que gera resíduos de antibióticos que podem atingir o solo, a água e os corpos hídricos, favorecendo a seleção e a disseminação de bactérias resistentes. Essas observações destacam a influência de ambientes antropizados na microbiota de animais silvestres e reforçam o valor dos enterococos como indicadores sentinela da qualidade ambiental em abordagens integradas de vigilância de Saúde Única⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

Dentre as 83 cepas resistentes, 45 (54,2 %) apresentaram resistência simples (SR), 21 (25,3 %) dupla (DR) e 17 (20,5 %) multirresistentes (MDR). Os enterococos isolados da cavidade retal apresentaram maior proporção de cepas MDR em comparação com os isolados da cavidade oral (Figura 2). A presença de cepas MDR pode estar associada à proximidade desses animais com atividades humanas, já que canídeos e felídeos selvagens compartilham o mesmo ambiente. Estudos anteriores reportaram enterococos MDR isolados de suabes retais de gatos-do-mato do bioma Pampa e de processos infecciosos em gatos domésticos hospitalizados no Sul do Brasil ^(27, 56). Esses achados reforçam a preocupação com a seleção e disseminação de bactérias multirresistentes entre animais e humanos.

A influência das atividades humanas na ocorrência de *Enterococcus* sp. resistentes em animais silvestres tem se tornado cada vez mais evidente, refletindo a relação entre pressão antrópica e a disseminação de mecanismos de resistência. Heck et al ⁽²⁸⁾ avaliaram enterococos isolados de serpentes de vida livre e em cativeiro e observaram que os animais sem contato com humanos apresentaram perfis de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Em contraste, as cepas isoladas de serpentes mantidas em cativeiro apresentaram resistência a várias classes de antibióticos. Da mesma forma, em estudo realizado com amostras de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) de vida livre, com contato frequente com humanos, verificou-se uma maior frequência de cepas resistentes, sugerindo que a exposição a ambientes antropizados pode favorecer a seleção e disseminação desses microrganismos ⁽²³⁾.

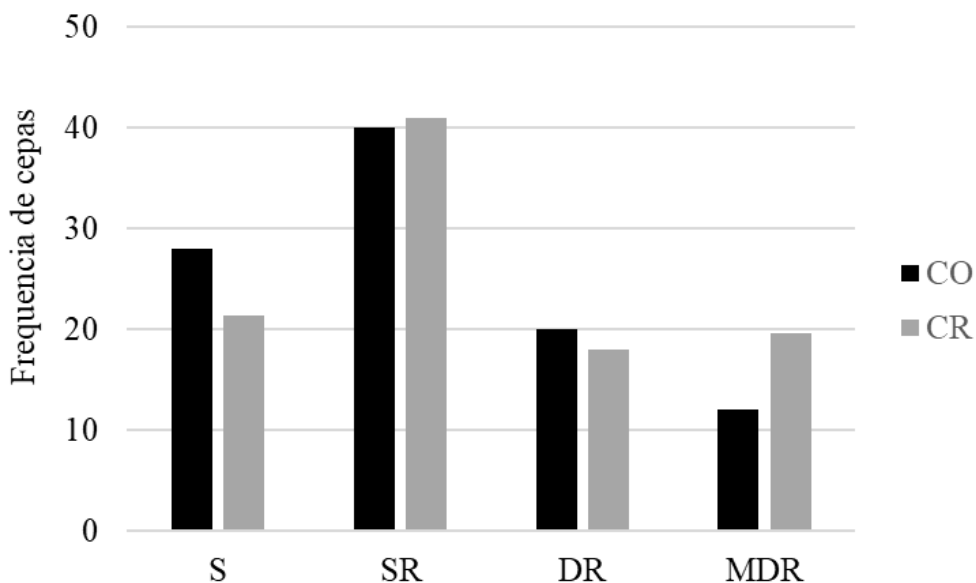


Figura 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos de enterococos isolados de amostras de cavidade oral (CO) e retal (CR) de gatos-do-mato-grande de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa, entre junho de 2022 e fevereiro de 2023. S: sensível, SR: resistência simples, DR: resistência dupla, MDR: resistência múltipla.

3.3 Detecção dos genes associados à resistência à tetraciclina (*tetL* e *tetM*) e eritromicina (*msrC* e *ermB*), e tolerância ao arsênio (*arsA_I* e *arsA_II*) e cobre (*tcrB*)

Após a análise do perfil de suscetibilidade das 111 cepas de enterococos, observou-se que isolados oriundos de um mesmo animal apresentaram padrões semelhantes de suscetibilidade ou resistência aos antimicrobianos testados, sugerindo possível relação

clonal entre esses isolados. Para evitar superestimação na análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos e tolerância a metais pesados, foram selecionadas 81 cepas com características fenotípicas distintas, 41 da cavidade retal (CR) e 40 da cavidade oral (CO).

Para a detecção dos determinantes de resistência, 30 cepas resistentes à eritromicina e 18 à tetraciclina foram submetidas à PCR convencional para detecção dos genes *ermB* e *msrC* (eritromicina) e *tetL* e *tetM* (tetraciclina) (Tabela 3). Entre as cepas resistentes à eritromicina, 13 apresentaram genes de resistência, das quais 12 (40,0 %) foram positivas para *msrC* e uma (3,3 %) apresentou concomitantemente os genes *ermB* e *msrC*. Das cepas positivas para *msrC*, 12 (92,3 %) pertenciam eram *E. faecium* e uma (7,7 %) *E. durans*. A cepa com ambos os genes foi identificada como *E. faecium* e isolada da cavidade oral. A presença do gene *msrC* em enterococos tem sido observada em amostras coletadas de animais silvestres ^(23, 2) e a literatura descreve o gene como específico para *E. faecium* ⁽⁶¹⁾, o que confirma a hipótese levantada, em que doze amostras positivas para o gene eram da espécie. Por outro lado, 17 cepas (56,6 %) não apresentaram amplificação de nenhum dos genes analisados, sugerindo a presença de outros genes de resistência à eritromicina não investigados neste estudo.

Das 18 cepas resistentes à tetraciclina, 5 (27,7 %) foram positivas para o gene *tetM*, uma (5,5 %) para *tetL* e 8 (44,4 %) para ambos os genes (Tabela 3). O gene *tetM* foi identificado em *E. faecium* (n=9), seguido por *E. durans* (n=2), *E. faecalis* (n=1) e *E. casseliflavus* (n=1). O gene *tetL* foi identificado em *E. faecium* (n=5), *E. durans* (n=3) e *E. casseliflavus* (n=1). Quatro cepas foram negativas para os genes testados, podendo ser positivas para outros genes associados à resistência à tetraciclina em enterococos.

Os resultados observados para os genes *tetL* e *tetM* estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram a presença desses genes em enterococos de animais silvestres, como no estudo de Araújo ⁽²⁷⁾. A elevada frequência do gene *tet* pode ser explicada por sua frequente associação com plasmídeos e elementos genéticos móveis ou conjugativos, que facilitam a transferência horizontal entre populações bacterianas ^(61, 62).

Todas as cepas também foram submetidas à PCR para detecção dos genes *arsA_I* e *arsA_II*, associados à tolerância ao arsênio (Tabela 3). Trinta e seis (44,4 %) cepas foram positivas para *arsA_I*, enquanto nenhuma apresentou amplificação para *arsA_II*. Em relação ao gene *tcrB*, associado à resistência ao cobre, todas as cepas testadas foram negativas.

A presença do gene *arsA_I* em enterococos isolados de felídeos de vida livre sugere que microrganismos tolerantes ao arsênio podem ser selecionados sob pressões de contaminação ambiental nesse habitat. A mineração e agricultura, exercidas amplamente na região de estudo, podem ser as fontes potenciais de poluição por arsênio ⁽⁶³⁾. Recentemente, Mocellin et al ⁽³³⁾ observaram uma associação da presença dos genes *arsA* em enterococos isolados de aves marinhas do Arquipélago de Abrolhos que apresentavam níveis elevados de As, Fe, Mn, Cd e Pb no sangue e/ou na plumagem após rompimento da barragem de Fundão. Esses achados reforçam a hipótese de que a ocorrência de genes de tolerância ao arsênio em enterococos ambientais reflete pressões seletivas exercidas pela exposição a metais por meio de cadeias alimentares e/ou habitats contaminados.

Tabela 3. Detecção de genes que conferem resistência à tetraciclina e à eritromicina e ao arsênio nas cepas de enterococos coletados da cavidade oral e retal de gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

Gene	Cavidade	Nº e espécies positivas para o gene	Nº total de cepas positivas para os genes	
Antimicrobianos				
Eritromicina (30)	<i>mrsC</i>	CO	4 <i>E. faecium</i>	4
		CR	7 <i>E. faecium</i> 1 <i>E. durans</i>	8
	<i>erm B+mrs C</i>	CO	1 <i>E. faecium</i>	1
	<i>tetL</i>	CR	1 <i>E. durans</i>	1
	<i>tetM</i>	CO	1 <i>E. faecalis</i>	1
CR		4 <i>E. faecium</i>	4	
Tetraciclina (18)	CO	1 <i>E. durans</i> 2 <i>E. faecium</i>	3	
		<i>tetM +tetL</i>	1 <i>E. casseliflavus</i>	
	CR	1 <i>E. durans</i> 3 <i>E. faecium</i>	5	
Metal pesado				
Arsênio (111)	<i>arsA_I</i>	CO	5 <i>E. casseliflavus</i> 2 <i>E. durans</i> 4 <i>E. faecium</i> 11 <i>E. faecalis</i>	22
		CR	2 <i>E. casseliflavus</i> 1 <i>E. durans</i> 5 <i>E. faecium</i> 5 <i>E. faecalis</i> 1 <i>E. hirae</i>	14

CO: Cavidade oral e CR: cavidade retal.

4. Conclusão

Enterococos resistentes a diversos antimicrobianos foram isolados das cavidades oral e retal de gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa, RS. Esses isolados carregaram genes de resistência à tetraciclina e à eritromicina (*mrsC*, *tetL*, *tetM*), bem como o gene de tolerância ao arsênio (*arsA_I*). A detecção dessas cepas evidencia a exposição dos felinos a ambientes impactados por atividades antrópicas. Portanto, esse estudo reforça o potencial dos enterococos como bioindicadores ambientais, ressaltando sua importância para a compreensão da interface entre saúde animal, saúde humana e conservação dos ecossistemas.

Material suplementar (disponível apenas na versão online: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/84024>)

Tabela S1. Informações biológicas e de captura dos gatos-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) de vida livre empregados presente no estudo.

Tabela S2. Distribuição das espécies de *Enterococcus* spp. entre as amostras da cavidade oral e retal de gatos-do-mato-grande de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

Tabela S3. Número (%) de cepas de enterococos resistentes isoladas da cavidade oral de gatos-do-mato-grande de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

Tabela S4. Número (%) de cepas de enterococos resistentes isoladas da cavidade retal de gatos-do-mato-grande de vida livre capturados na região do Seival, em Candiota, no bioma Pampa entre junho de 2022 e fevereiro de 2023.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

O conjunto completo de dados que suporta os resultados deste estudo foi publicado no artigo e na seção "Material Suplementar".

Contribuições do autor

Conceitualização: Toigo, A. L., Frazzon, A. P. G.; Curadoria de dados: Toigo, A. L., Cassol, M. G., Frazzon, A. P. G.; Análise formal: Toigo, A. L., Cassol, M. G., Frazzon, A. P. G.; Obtenção de financiamento: Frazzon, A. P. G.; Investigação: Toigo, A. L., Cassol, M. G., Frazzon, A. P. G.; Metodologia: Frazzon, A. P. G.; Recursos: Peters, F. B., Albano, A. P. N., Favarini, M. O.; Orientação: Prichula, J., Frazzon, A. P. G.; Supervisão: Frazzon, A. P. G.; Visualização: Toigo, A. L., Cassol, M. G., Lozano, L. M. V., Frazzon, A. P. G.; Redação (rascunho original): Toigo, A. L., Lozano, L. M. V., Prichula, J., Frazzon, A. P. G.; Redação (revisão e edição): Peters, F. B., Albano, A. P. N., Favarini, M. O., Lozano, L. M. V., Prichula, J., Frazzon, A. P. G.

Declaração de uso de IA generativa

Durante a preparação deste manuscrito, os autores utilizaram o ChatGPT para gerar a imagem do gato-do-mato apresentada na Figura 1. Após a utilização desta ferramenta/serviço, os autores revisaram e editaram o conteúdo apropriadamente e assumem total responsabilidade pelo conteúdo da publicação.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Governo Brasileiro, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil e ao Projeto Felinos do Pampa.

Referências

1. Bilenca D, Miñarro F. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Argentina; 2004. Disponível em: http://awsassets.wwf.panda.org/downloads/libro_avps_bilenca_y_minarro_2004_.pdf
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Biomas e sistema costeiro-marinho do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101676.pdf>
3. Andrade BO, Dröse W, Aguiar CAD, et al. 12,500+ and counting: biodiversity of the Brazilian Pampa. Front Biogeogr 2023 15.2, e59288. Disponível em: <https://doi.org/10.21425/F5FBG59288>
4. Centro De Sensoriamento Remoto (CRS), Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais (INPE). Relatório técnico do monitoramento do desmatamento do Bioma Pampa 2008-2009. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (MMA); 2010. Disponível em: https://antigo.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatrio_tcnico_monitoramento_pampa_2008_2009_72.pdf
5. Ziliotto M, Kulmann-Leal B, Roitman A, et al. Pesticide pollution in the Brazilian Pampa: Detrimental impacts on ecosystems and human health in a neglected biome. Pollutants 2023;3(2):280–292. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pollutants3020020>
6. Stockwell S. Working in Brazilian wildcat conservation with Flavia Tirelli 2023; Disponível em: <https://www.conservation-careers.com/interviews/working-in-brazilian-wildcat-conservation-with-flavia-tirelli/>
7. International Union For Conservation Of Nature (IUCN). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-1. 2025. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>
8. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA no. 148, de 7 de junho de 2022. Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçadas de extinção. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2022. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>
9. Governador Do Estado Do Rio Grande Do Sul. Decreto no. 51.797, de 8 de setembro de 2014. Espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2014. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul DOE nº 173, de 09 de setembro de 2014. Disponível em: <https://leisestaduais.com.br/rs/decreto-n-51797-2014-rio-grande-do-sul-declara-as-especies-da-fauna-silvestre-ameacadas-de-extincao-no-estado-do-rio-grande-do-sul>. Acesso em: 18 fev. 2026
10. Pereira J, Lucherini M, Trigo T. *Leopardus geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species [Homepage on the Internet]. IUCN Red List Threat. Species. 2015; Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/15310/50657011>
11. Peters FB, Mazim F, Favarini, MO, et al. Caça preventiva ou retaliativa de felinos por humanos no extremo sul do Brasil. In: Castaño-Urbe C, editor. Conflicts entre felinos y humanos en América Latina. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), 2016; p. 311–325.

12. Tirelli FP, Mazim FD, Crawshaw Jr PG, et al. Density and spatio-temporal behaviour of Geoffroy's cats in a human-dominated landscape of southern Brazil. *Mamm Biol* 2019;99(1):128–135. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2019.11.003>
13. Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions: a review. *Gene* 1996;179(1):9–19. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00323-X)
14. Ines-Lima J, Prichula J, Abadie M, et al. Anthropic impact on the critically endangered *Melanophryniscus admirabilis* (Admirable Redbelly Toad): evidence from the presence of multiresistant enterobacteriaceae. *Curr Microbiol*. 2023;80(11):339. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03433-7>
15. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, et al. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(4):685–706. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
16. Gaca AO, Lemos JA. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019;83(3):10.1128/membr. 00008-19. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-19>.
17. Aktan Y, Tan S, Içgen B. Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environ Monit Assess* 2013;185(6):5285–5293. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2945-x>.
18. Silva VL da, Caçador NC, Silva C dos SF da, et al. Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. *Microbes Environ* 2012;27(2):179–185. Disponível em: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11296>
19. De Niederhaeusern S, Bondi M, Anacarso I, et al. Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *J Environ Sci Health Part A* 2013;48(8):939–946. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.762739>
20. Novais C, Campos J, Freitas AR, et al. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *Sci Total Environ* 2018;625:1102–1112. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.265>
21. Rebelo A, Mourão J, Freitas AR, et al. Diversity of metal and antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. from the last century reflects multiple pollution and genetic exchange among phyla from overlapping ecosystems. *Sci Total Environ* 2021;787:147548. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147548>
22. Lebreton F, Willems RJ, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014–. PMID: 24649513. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
23. Santestevan NA, Angelis Zvoboda D de, Prichula J, et al. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World J Microbiol Biotechnol* 2015;31(12):1935–1946. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1938-7>
24. Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, et al. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Mar Pollut Bull* 2016;105(1):51–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.071>
25. Grassotti TT, Zvoboda DA, Costa LFX, et al. Antimicrobial resistance profiles in *Enterococcus* spp. isolates from fecal samples of wild and captive black Capuchin Monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. *Front Microbiol* 2018;9:2366. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02366>
26. Huff R, Pereira RI, Pissetti C, et al. Antimicrobial resistance and genetic relationships of enterococci from siblings and non-siblings *Heliconius erato* phyllis caterpillars. *PeerJ* 2020;8:e8647. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.8647>
27. de Araujo GO, Huff R, Favarini MO, et al. Multidrug resistance in enterococci isolated from wild Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and Geoffroy's Cats (*Leopardus geoffroyi*) in the Brazilian Pampa biome. *Front Vet Sci* 2020;7. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.606377>
28. Heck JMS, Prichula J, Huff R, et al. Captive snakes from Brazil as carriers of multidrug-resistant enterococci. *Int J Plant Anim Environ Sci* 2021;11(3):503–523. Disponível em: <https://doi.org/10.26502/ijpaes.202118>
29. Schwartzman JA, Lebreton F, Salamzade R, et al. Global diversity of enterococci and description of 18 previously unknown species. *Proc Natl Acad Sci* 2024;121(10):e2310852121. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2310852121>
30. Ture M, Altinok I, Alp H. Effects of cage farming on antimicrobial and heavy metal resistance of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus garvieae*. *Microb Drug Resist* 2018;24(9):1422–1430. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0040>

31. Vignaroli C, Pasquaroli S, Citterio B, et al. Antibiotic and heavy metal resistance in enterococci from coastal marine sediment. *Environ Pollut* 2018;237:406–413. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.073>
32. Prichula J, Van Tyne D, Schwartzman J, et al. Enterococci from wild Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) as an indicator of marine ecosystem health and human impact. *Appl Environ Microbiol* 2020;86(19). Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01662-20>
33. Mocellin RR, Toigo AL, Santos CC dos, et al. Metal tolerance in enterococci isolated from seabirds in Abrolhos Archipelago, Brazil: Evaluating their role as bioindicators of marine pollution. *Mar Pollut Bull* 2024;207:116866. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116866>
34. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico 2022: Candiota, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/candiota.html>. Acesso em: 18 fev. 2026.
35. Prefeitura Municipal de Candiota. A economia local de Candiota. 2023; Disponível em: <https://www.candiota.rs.gov.br/>
36. Sikes RS, Gannon WL, Animal care and use committee of the american society of mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 2011;92(1):235–253. Disponível em: <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>
37. Sauguet M, Valot B, Bertrand X, et al. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol* 2017;25(6):447–455. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>
38. Cartwright CP, Stock F, Fahle GA, et al. Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1931–1933. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1931-1933.1995>.
39. Kirby WM, Bauer AW, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):493–6.
40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
41. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(3):268–281. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
42. Bell JM, Paton JC, Turnidge EJ. Emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.2187–2190, 1998. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:2187–2190. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.36.8.2187-2190.1998>
43. Hasman H, Kempf I, Chidaine B, et al. Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9):5784–5789. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02979-05>
44. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(11):2562–2566. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2562>
45. Werner G, Hildebrandt B, Witte W. The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(12):3672–3673. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3672-3673.2001>
46. Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet (M) and tet (L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26(2):365–370. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0160-x>
47. Aarestrup FM, Agero Y, Gerner–Smidt P, et al. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37(2):127–137. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00130-9)
48. Manfredi C, Lucherini M, Canepuccia AD, et al. Geographical variation in the diet of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in Pampas grassland of Argentina. *J Mammal* 2004;85(6):1111–1115. Disponível em: <https://doi.org/10.1644/BWG-133.1>
49. Sousa KS, Bager A. Feeding habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in southern Brazil. *Mamm Biol* 2008;73(4):303–308. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2007.04.001>
50. Trigo TC, Tirelli FP, Machado LF, et al. Geographic distribution and food habits of *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* (Carnivora, Felidae) at their geographic contact zone in southern Brazil. *Stud Neotropical Fauna Environ* 2013;48(1):56–67. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01650521.2013.774789>

51. Migliorini RP, Peters FB, Favarini MO, et al. Trophic ecology of sympatric small cats in the Brazilian Pampa. PLoS One 2018;13(7):e0201257. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201257>
52. Pereira JA, Aprile G. Gato montés (*Oncifelis geoffroyi*). In: Felinos de Sudamérica: Manuales de campo. Londaiz Laborde Ediciones. Londaiz Laborde Ediciones. Buenos Aires; 2012. Cap. VII. p. 64-69. Espanhol.
53. Lauková A, Stropfová V, Simonová M, et al. Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. Folia Microbiol (Praha) 2008;53(2):173–178.
54. Poeta P, Costa D, Sáenz Y, et al. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. J Vet Med 2005;52(9):396–402. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00881.x>
55. Cassenego APV, Ellwanger J, Azevedo PA d', et al. Virulence and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates from cloacal swabs of broilers infected with Eimeria spp. Pesq Vet Bras 2013;33:1433–1440. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200007>
56. Silva L da, Grecellé CZ, Frazzon APG, et al. Multidrug-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from dogs and cats in southern Brazil. Microbiol Res 2024;15(3):1083–1090. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030071>
57. Grenni P, Ancona V, Caracciolo AB. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchem J 2018;136:25–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
58. Santana CB dos S, Mattos MCC de, Paz RS, et al. Análise do consumo de cloridrato de tetraciclina para uso veterinário no Brasil. Rev Contemp 2023;3(12):26378–26395. Disponível em: <https://doi.org/10.56083/RCV3N12-086>
59. Portella DN, Faria EC, Hennequin IS, et al. Impactos causados no meio ambiente por resíduos antimicrobianos de uso veterinário: Impacts caused on the environment use antimicrobial waste. Braz J Anim Environ Res 2023;6(4):3708–3722. Disponível em: <https://doi.org/10.34188/bjaerv6n4-049>
60. Silva RA da, Luiza VL, Bermudez JAZ, et al. The One Health approach to face bacterial resistance to antibiotics in livestock production. Saúde Em Debate 2025;49:e9713. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2358-289820251449713i>
61. Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916–Tn1545 family of conjugative transposons. Trends Microbiol 1995;3(6):229–236. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88930-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88930-1)
62. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2001;65(2):232–260. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
63. Souza JM, Carneiro MF, Paulelli ACC, et al. Arsenic and rice: toxicity, metabolism, and food safety. Quím Nova 2015; 38(1): 118-127. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140279>