

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**DIVERSIDADE E PERFIL ANTIMICROBIANO DE *Enterococcus*
spp. ISOLADOS DE FEZES DE IMATUROS DE *Heliconius erato*
phyllis (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)**

Aluna: Rosana Huff

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

Trabalho apresentado como requisito
para a obtenção do título de Bacharel
no Curso de Ciências Biológicas

Porto Alegre, julho de 2016.

Redigido segundo as normas da revista *Applied and Environmental Microbiology*.

Diversidade e perfil antimicrobiano de *Enterococcus* spp. isolados de fezes de imaturos de *Heliconius erato phyllis* (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)

Rosana Huff, Aldo Mellender de Araújo¹ e Ana Paula Guedes Frazzon.

Rosana Huff

Laboratório de Genética Ecológica e Evolução. Departamento de Genética, Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: rosana_huff@hotmail.com

Aldo Mellender de Araújo

Laboratório de Genética Ecológica e Evolução. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 91501-970.

E-mail: aldo1806@gmail.com

Ana Paula Guedes Frazzon

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: ana.frazzon@ufrgs.br

RESUMO

Borboletas do gênero *Heliconius* (Lepidoptera-Nymphalidae) estão presentes desde florestas até ambientes urbanos e são organismos modelo para estudos ecológicos e evolutivos, porém pouco se sabe a respeito da microbiota destes insetos. Um trabalho recente identificou *Enterococcus* como o gênero de bactérias mais frequente em amostras de lagartas e adultos de *Heliconius*. Micro-organismos do gênero *Enterococcus* são gram-positivos, catalase negativos, com morfologia celular de diplococos ou cocos de cadeias curtas que toleram concentrações de 6,5% de NaCl e variações de temperatura de 10-45°C, além de possuírem resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos. Estas bactérias são muitas vezes relacionadas a infecções humanas ou ao trato gastrointestinal de animais de sangue quente, porém podem ser encontradas em diversas fontes não entéricas como solo, vegetação e ambientes aquáticos. No presente trabalho, lagartas de quinto estágio provenientes de três locais do Rio Grande do Sul, Brasil, foram analisadas quanto à presença de diferentes espécies de *Enterococcus*. Pelo menos duas espécies desta bactéria foram encontradas em fezes de lagartas provenientes de fêmeas das três localidades. Além disso, foi avaliado o perfil de resistência destes isolados frente a 11 antimicrobianos de importância clínica e veterinária; os isolados apresentaram resistência ao antibiótico rifampicina e resistência intermediária a eritromicina, norfloxacina e ciprofloxacina.

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* foi oficialmente aceito em 1984 quando os pesquisadores Schleifer e Kilpper-Balz apresentaram evidências genéticas de que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* eram suficientemente distantes de outros membros do gênero *Streptococcus* (1,2). Após a criação do gênero, o uso de metodologias similares mostrou que outras espécies como *Streptococcus avium*, *Streptococcus casseliflavus*, *Streptococcus durans* e *Streptococcus gallinarum* eram também espécies do gênero (2,3).

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* são bactérias gram-positivas, arrançadas aos pares ou como cadeias curtas (1). São catalase negativas, não formadoras de endósporos, podendo apresentar motilidade e pigmentação em algumas espécies (*E. casseliflavus* e *E. mundtii*). A temperatura ótima de crescimento é de 35 °C, porém suportam temperaturas entre 10-45°C e pH entre 4.5-10.0, além de suportarem aquecimento a 60°C durante 30 minutos (1). Outra característica que distingue o gênero é sua capacidade de crescer em concentrações de 6,5% de NaCl e hidrolisar a esculina na presença de sais biliares (4). Sua maior tolerância à salinidade do ambiente pode contribuir para um melhor desempenho como indicador de águas marinhas com risco para a saúde humana do que membros do grupo coliformes (5).

Enterococos apresentam resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, além de serem capazes de adquirir resistência (3). Esta característica causa preocupação principalmente na área clínica devido a dificuldades no tratamento de infecções no trato urinário e endocardites, por exemplo, assim como no âmbito ambiental devido a potencial disseminação destas cepas resistentes no ambiente.

É notável que as primeiras espécies de *Enterococcus* descritas estavam muitas vezes relacionadas a infecções humanas, como *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* consideradas mais abundantes em fezes humanas e infecções (2).

Apesar da presença destas bactérias em infecções humanas e no trato gastrointestinal (TGI) de animais de sangue quente, sua ocorrência é amplamente distribuída em uma variedade de habitats incluindo fontes não entéricas como solo, sedimentos, plantas aquáticas e terrestres e em ambientes aquáticos (5); estes habitats com temperaturas variáveis contrastam com ambientes como o TGI de animais de sangue quente, onde a temperatura é relativamente constante (5). Sua ampla distribuição se deve a grande capacidade de sobrevivência sob condições ambientais adversas, caracterizando estas bactérias como micro-organismos ubíquos (2).

Diversas bactérias já foram descritas habitando o TGI de uma grande variedade de insetos, incluindo abelhas, moscas e cupins (6). Recentemente, Hammer e col. demonstraram que a espécie *Heliconius erato* possui comunidades microbianas no TGI relativamente simples quando comparada a vertebrados, e que o gênero mais abundante em todas as amostras pesquisadas, tanto de lagartas quanto de adultos, foi *Enterococcus* (7); outras evidências da presença de enterococos no TGI de lagartas de outros lepidópteros já foram encontradas (8, 9), além da persistência deste gênero após a metamorfose (7, 10).

As borboletas do gênero *Heliconius* são representantes da fauna Neotropical, sendo que cerca de 40 espécies estão registradas para esta área. Inúmeros trabalhos têm sido publicados sobre as espécies deste gênero, incluindo aspectos ecológicos (11), interações inseto-planta (12), evolução do mimetismo (13), aspectos genômicos da adaptação (14), dentre outros. No Rio Grande do Sul ocorrem principalmente as

espécies: *H. ethilla narcaea*, *H. besckei* e *H. erato phyllis*. Esta última (Fig. 1) ocorre desde o nordeste do Brasil até o norte da Argentina (15) e possui uma alta plasticidade ecológica, estando presente em praticamente todos os tipos de habitats, desde florestas até ambientes urbanos (16).



Figura 1. Adultos de *Heliconius erato phyllis* em insetário. Fonte: Laboratório de Genética Ecológica e Evolução - UFRGS.

Sendo assim, são necessários estudos que propõe uma nova e original abordagem no conhecimento a respeito desta borboleta. Pesquisas envolvendo a microbiologia de *H. erato phyllis*, tanto em lagartas como em adultos, ainda são pouquíssimo estudadas. Um exemplo recente, e até o momento, o único, é o estudo de Hammer e cols., que trabalharam com adultos e lagartas de *H. erato petiverana*, uma subespécie do Panamá.

O presente estudo teve como objetivo ampliar os conhecimentos acerca da presença de bactérias do gênero *Enterococcus* nas fezes de imaturos da espécie *H. erato phyllis* do sul do Brasil, cujas condições ecológicas são muito diversas daquelas do estudo anterior. Para tanto, foram isoladas bactérias do gênero *Enterococcus* nas fezes de lagartas de quinto estágio desta borboleta, identificadas as espécies e avaliado o perfil de susceptibilidade frente a 11 antibióticos de importância clínica e veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Amostras

A fim de obter as amostras de fezes das lagartas de quinto ínstar (estádio) de *H. erato phyllis* foram realizadas coletas de fêmeas adultas com auxílio de redes entomológicas em três localidades do Estado do Rio Grande do Sul (RS): Estação Agronômica de Águas Belas, FEPAGRO-RS (30°02'18.1"S 51°01'23.0"W) (fêmea HEAB2), Viamão (30°09'40.5"S 50°55'01.5"W) (fêmea HEV2) e São Francisco de Paula (29°26'34.1"S 50°36'48.8"W) (fêmea HES2). Os adultos coletados foram identificados e mantidos em insetários de aproximadamente 2,5m x 3m x 3m (largura, comprimento e altura) situados ao lado do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS. Os insetários simularam condições naturais contendo diversas plantas, incluindo *Passiflora suberosa*, utilizada pelas fêmeas para ovoposição (Fig. 2). As fêmeas foram alimentadas diariamente em pequenos recipientes contendo uma mistura de água, mel e pólen (Fig. 3), seguido da coleta de ovos com o auxílio de pincéis. Os ovos foram levados ao laboratório e depositados em potes sobre uma folha de papel absorvente úmido ao fundo, a fim de que a umidade do microambiente fosse mantida. Os imaturos foram alimentados diariamente com *Passiflora suberosa*.

As amostras de fezes foram coletadas dos potes de lagartas de quinto estágio, nas 48 horas deste estágio, com auxílio de colher plástica, colocadas em microtubos e transportadas ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS, onde as análises foram realizadas. As amostras de fezes foram acondicionadas em -70 °C até que as análises fossem realizadas.



Figura 2. *Passiflora suberosa* (setas amarelas) utilizada pelas fêmeas para ovoposição. Fonte: Laboratório de Genética Ecológica e Evolução - UFRGS.



Figura 3. Adultos de *Heliconius erato phyllis* em insetário alimentando-se de mistura contendo água, mel e pólen. Fonte: Laboratório de Genética Ecológica e Evolução - UFRGS.

A amostra total foi representada por: cinco amostras de fezes de imaturos da fêmea da Estação Experimental Agronômica de Águas Belas (HEAB2), cinco amostras de fezes de imaturos da fêmea de Viamão (HEV2) e duas amostras de fezes de imaturos da fêmea de São Francisco de Paula (HES2), totalizando 12 amostras de fezes.

Isolamento de Enterococcus spp.

Para realizar o isolamento das bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram pesados 100 mg de fezes de cada amostra em balança analítica, e em seguida as mesmas foram adicionadas em tubos contendo água peptonada estéril, a fim de que a amostra fosse ressuspensa em meio líquido; os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas. Após a incubação foi transferido em ambiente estéril 1 mL das amostras ressuspensas para 9 mL de Caldo Azida Dextrose, incubando novamente os tubos a 35 °C por 24 horas.

O Caldo Azida foi utilizado devido a sua propriedade seletiva para enterococos e estreptococos (inibição do transporte de elétrons). Após a incubação os tubos foram homogeneizados e em seguida realizou-se diluições seriadas utilizando 1 mL do Caldo Azida incubado em 9 mL de Solução Salina 0,85% esterilizada até a concentração 10^{-6} , utilizando somente as diluições de 10^{-5} e 10^{-6} para prosseguir com o isolamento.

Uma alíquota de 100 µl de cada diluição selecionada foi plaqueada em duplicata com auxílio de alça de Drigalski em Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) contendo 6,5% NaCl; a adição de sal no meio de cultura é utilizada como meio seletivo, já que enterococos toleram altas salinidades durante seu crescimento. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

Para avaliar a diversidade de enterococos nas amostras de fezes foram selecionadas de 20 a 25 unidades formadoras de colônias (UFC) e semeadas em meio seletivo diferencial Ágar Bile Esculina (BEA), incubando as placas a 35 °C por 24 horas. O meio BEA foi o terceiro meio seletivo utilizado; a hidrólise da esculina na presença de bile gera glicose e esculetina, que reage com íons de ferro presentes no meio, resultando na presença de uma coloração escura no meio de cultura, identificação presuntiva para o gênero *Enterococcus*. Após a incubação, os isolados positivos para a degradação da esculina, com escurecimento do meio de cultura, foram semeados por esgotamento em meio BHI e incubados a 35 °C por 24 horas.

A partir do isolamento de colônias puras em meio BHI, as mesmas foram submetidas à coloração de Gram. Sobre uma lâmina histológica limpa foi preparado o esfregaço da cultura previamente emulsionada em água, sendo fixado em chama. O esfregaço fixado foi corado com solução de Cristal Violeta durante 1 minuto; a lâmina foi lavada em água corrente e em seguida foi coberta com solução de Iodo durante 1 minuto; a lâmina foi lavada novamente e o esfregaço foi descorado com Álcool Cetona

durante 30 segundos; novamente a lâmina foi lavada e aplicou-se o corante Fucsina durante 30 segundos; por fim a lâmina foi lavada e seca, a fim de que fosse realizada a análise da morfologia das células sob microscópio óptico (1000x). As colônias típicas de enterococos são gram-positivas, com morfologia celular de diplococos ou cocos de cadeia curta. Os isolados que apresentaram resultado típico na coloração de Gram foram submetidos ao teste da catalase.

O teste da enzima catalase foi utilizado devido à sua propriedade de distinguir *Enterococcus* (catalase negativos) de outros cocos gram-positivos produtores da enzima, como o gênero *Staphylococcus*. Esta enzima degrada o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água, sendo que a liberação de oxigênio pode ser observada pela formação de bolhas junto à colônia. Foi verificada a produção da enzima catalase utilizando peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). Sobre uma lâmina histológica limpa foi adicionado uma alçada da cultura isolada e em seguida adicionou-se três gotas de peróxido de hidrogênio, observando a imediata formação ou não formação de bolhas. O gênero *Enterococcus* não possui a enzima catalase, logo o resultado esperado para este teste foi a não formação de bolhas, caracterizando resultado negativo. Os isolados com resultado negativo para catalase foram classificados como *Enterococcus* spp., porém técnicas moleculares foram utilizadas para segunda confirmação do gênero.

Os isolados catalase negativos foram mantidos sob a forma de suspensão em solução contendo 10% de leite desnatado em pó (Molico) e glicerol 10% (v/v), e armazenados em criotubos sob refrigeração a -20 °C.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído pelo método físico-químico (17) em que uma alíquota da amostra em leite molico e glicerol foi semeada por esgotamento em ágar BHI e

incubada a 35 °C por 24 horas; em seguida uma “alçada” deste crescimento foi transferida para tubo contendo 2mL de caldo BHI, incubado a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, 1 mL deste crescimento foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 40 µL de solução de lise [5 mL de NaOH 1M; 2,5 mL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)]. O *pellet* ressuspensionado na solução de lise foi submetido a banho seco a 100 °C durante 15 minutos e, posteriormente, foi diluído em 460µL de tampão TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,8), homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novo microtubo e armazenado sob refrigeração a -20 °C.

Confirmação do gênero Enterococcus

Para confirmação do gênero *Enterococcus* nos isolados foi realizada a técnica de PCR gênero-específico para a presença do gene *tuf*, seguindo o protocolo descrito por Ke et al., 1999 (18). As informações a respeito dos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se na Tabela 1.

Para a reação de PCR foram utilizados 25 µL de volume total, contendo: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *2720 Thermal Cycler* nas seguintes condições: 3 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C e 1 minuto a 72 °C; por fim 7 minutos a 72 °C.

A cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo nas reações. O produto esperado de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen[®]).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR gênero-específico (*tuf*) e espécie-específicos (*E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *E. faecium*) e tamanhos dos fragmentos gerados.

Espécie	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Produto (pb)	Referência
<i>Enterococcus</i> spp.	tuf-F	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Ke et al. (1999)
	tuf-R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>E. casseliflavus</i>	CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288	Jackson et al. (2004)
	CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG		
<i>E. faecalis</i>	E16s-F	CCGAGTGCTTGCCTCAATTGG	138	Sedglet et al. (2005)
	E16s-R	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC		
<i>E. mundtii</i>	MU1-F	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	94	Jackson et al. (2004)
	MU2-R	GCCATGATTTTCCAGAAGAATG		
<i>E. faecium</i>	EM1A-F	TTGAGGGACACCAGATTGACG	658	Cheng et al. (1997)
	EM1B-R	TATGACAGCGACTCCGATTCC		

Identificação das espécies

A identificação das espécies foi realizada para todas as amostras com resultado positivo no PCR específico para gênero utilizando o gene *tuf*. As espécies pesquisadas foram: *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *E. faecium*. Para a espécie *E. casseliflavus* foram empregados os iniciadores *CA*_{1/2} (19), com produto esperado de 288 pb e temperatura de anelamento de 59 °C; para *E. faecalis* os iniciadores *E16s* (20), com produto esperado de 138 pb e temperatura de anelamento de 66 °C; para *E. mundtii* os iniciadores *MU*_{1/2} (19), com produto esperado de 94 pb e temperatura de anelamento de 60 °C; e para *E. faecium* os iniciadores *EM*_{A/B} (21), com produto esperado de 658 pb e temperatura de anelamento de 62 °C.

As informações a respeito dos oligonucleotídeos iniciadores encontram-se na Tabela 1. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *2720 Thermal Cycler* seguindo as mesmas condições realizadas para o gene *tuf*, sendo alteradas apenas as temperaturas de anelamento para cada espécie testada.

As cepas *E. casseliflavus* PAD71, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. mundtii* J5 e *E. faecium* SS1274 foram utilizadas como controle positivo nas reações. Os produtos esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen[®]).

Estimativas para o índice de diversidade de Shannon foram feitas para as três localidades, utilizando-se a expressão $H = - \sum p_i \times (\ln p_i)$, onde H é o índice de diversidade e p_i a frequência de cada espécie em cada localidade.

Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada apenas para as bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. empregando o método de disco-difusão em Ágar, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (22). Uma “alçada” dos isolados mantidos em solução de leite e glicerol foi semeada por método de esgotamento em placas contendo ágar BHI; as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas. Após a incubação as colônias foram suspensas em solução salina 0,85% estéril até se obter uma turvação semelhante à solução padrão 0,5 da escala Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As suspensões foram semeadas com o auxílio de *swabs* esterilizados sobre a superfície seca das placas contendo Ágar Müeller-Hinton para obter-se um crescimento uniforme e confluyente. Em seguida, sobre a superfície dos meios inoculados foram colocados os discos contendo os seguintes antibióticos: nitrofurantoína - NIT (300 µg), tetraciclina - TET

(30 µg), eritromicina - ERI (15 µg), norfloxacin - NOR (10 µg), cloranfenicol - CLO (30 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), ampicilina - AMP (10 µg), rifampicina - RIF (5 µg) e vancomicina - VAN (30 µg) (Oxoid, Vasingstoke, UK). Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos foram utilizados discos de estreptomicina - EST (300 µg) e gentamicina - GEN (120 µg) (Oxoid, Vasingstoke, UK), como preconiza o CLSI (21). Após incubação a 35 °C por 24 horas foi realizada a medição e as interpretações dos diâmetros dos halos de inibição.

RESULTADOS

Isolamento e confirmação do gênero Enterococcus por PCR

Doze amostras fecais de lagartas do quinto estágio de *H. erato phyllis* serviram como material de referência para obtenção dos micro-organismos a serem analisados no presente estudo. Das 12 amostras coletadas inicialmente foram obtidos 243 isolados, os quais foram classificados presuntivamente como *Enterococcus* spp. por apresentaram crescimento em Caldo Azida Dextrose, resultado negativo para o teste da catalase, mostraram-se capazes de crescer em meio BHI contendo 6,5% de NaCl, além de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares. Não obstante, a morfologia dos isolados era característica de diplococos gram-positivos.

Dos 243 isolados com confirmação presuntiva submetidos ao PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos pra o gene *tuf*, 180 (74%) confirmaram pertencer ao gênero *Enterococcus* e 63 (26%) não apresentaram resultado confirmatório, sendo classificados como não-enterococos.

O total de isolados por fêmea e o número de positivos e negativos para o gênero *Enterococcus* está ilustrado na Tabela 2.

Em relação à distribuição do gênero *Enterococcus* por localidade, observou-se que dos 102 isolados obtidos da amostra de fezes das lagartas de *H. erato phyllis* provenientes da fêmea HEAB2, 99 (97%) confirmaram pertencer ao gênero; dos 95 isolados selecionados das amostras de fezes de lagartas da fêmea HEV2, 65 (68%) confirmaram pertencer ao gênero e dos 46 isolados selecionados da fêmea HES2, somente 16 (35%) confirmaram pertencer ao gênero.

Tabela 2. Isolados positivos e negativos para o gênero *Enterococcus* em amostras de fezes de imaturos de *Heliconius erato phyllis* após realização de PCR empregando oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos.

Fêmea	<i>Enterococcus</i> spp.	Não - <i>Enterococcus</i>	Total
HEAB2	99	3	102
HEV2	65	30	95
HES2	16	30	46
Total	180	63	243

Os 63 isolados negativos foram eliminados do estudo por não apresentarem resultado confirmatório no PCR gênero-específico, sendo assim, somente testou-se a distribuição de espécies nos 180 isolados restantes com teste confirmatório para o gênero *Enterococcus*.

Identificação das espécies por PCR

Dos 180 isolados submetidos a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *E. faecium*, 169

(94%) amplificaram para uma das espécies testadas e 11 (6%) não amplificaram os fragmentos para nenhuma das espécies testadas, e foram identificados apenas como *Enterococcus* spp. Do total de 180, 134 (74%) apresentaram resultado positivo para *E. casseliflavus*, 33 (18%) resultado positivo nas análises realizadas para *E. mundtii* e dois isolados (1%) amplificaram o fragmento de DNA esperado para a espécie *E. faecalis*.

Nenhum dos isolados testados amplificaram o fragmento de DNA de 658 pb esperado para a espécie *E. faecium*. Os dados da distribuição de espécies de *Enterococcus* nas amostras analisadas estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de isolados das espécies de enterococos em amostras de fezes de imaturos de *H. erato phyllis*.

Fêmea	Espécies				Total
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
HEAB2	82	2	11	4	99
HEV2	48	0	16	1	65
HES2	4	0	6	6	16
Total	134	2	33	11	180

Em relação à distribuição das espécies por amostra, observou-se que as fezes das lagartas de *H. erato phyllis* provenientes da fêmea HEAB2 eram compostas pelas espécies *E. casseliflavus* (83%), *E. faecalis* (2%) e *E. mundtii* (11%).

As amostras provenientes das fêmeas HEV2 e HES2 apresentaram as espécies *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, sendo que para as lagartas da fêmea HEV2 a espécie *E. casseliflavus* foi a mais frequente (74%) e para as lagartas da fêmea HES2 foi *E. mundtii* (38%).

Mesmo levando em conta possíveis violações de pressupostos para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon, estes foram estimados para as três localidades estudadas (os 11 isolados identificados apenas como *Enterococcus* spp. foram desconsiderados desta análise). A amostra mais diversa foi a proveniente de São Francisco de Paula (HES2), com $H = 0,673$, seguida da amostra de Viamão (HEV2), com $H = 0,562$ e a de Águas Belas (HEAB2), com $H = 0,458$.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos em 172 isolados, não sendo realizados testes para 8 isolados (2 *E. casseliflavus*, 3 *E. mundtii* e 3 *Enterococcus* spp.), devido principalmente à premência de tempo devido à análise dos dados e redação do presente trabalho.

Todos os isolados testados foram sensíveis aos antibióticos gentamicina (GEN), estreptomicina (EST), tetraciclina (TET), vancomicina (VAN), cloranfenicol (CLO), nitroflurantoína (NIT) e ampicilina (AMP). Para os antibióticos rifampicina (RIF), eritromicina (ERI), norfloxacin (NOR) e ciprofloxacina (CIP) foram encontrados os perfis antimicrobianos ilustrados na Tabela 4.

Todos os isolados de *E. mundtii* (n=30) foram sensíveis aos onze antimicrobianos testados. Do total de 132 *E. casseliflavus* testados, 86 (65%) apresentaram resistência à rifampicina e 6 (5%) resistência intermediária à rifampicina, 50 (38%) resistência intermediária à eritromicina, 8 (6%) resistência intermediária à norfloxacin e 4 (3%) resistência intermediária à ciprofloxacina.

Para *E. faecalis*, os 2 (100%) isolados testados apresentaram resistência intermediária à rifampicina e eritromicina. Para os isolados classificados apenas como

Enterococcus spp., 4 (50%) apresentaram resistência à rifampicina e 2 (25%) resistência intermediária à eritromicina.

Tabela 4. Perfil de resistência aos antimicrobianos nas espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. mundtii* e *Enterococcus* spp. para quatro antibióticos testados em isolados de amostras de fezes de imaturos de *H. erato phyllis*.

Espécie	Número de enterococos resistentes aos antibióticos							
	RIF		ERI		NOR		CIP	
	r	i	r	i	r	i	r	i
<i>E. casseliflavus</i> (n=132)	86	6	0	50	0	8	0	4
<i>E. faecalis</i> (n=2)	0	2	0	2	0	0	0	0
<i>E. mundtii</i> (n=30)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp. (n=8)	4	0	0	2	0	0	0	0
Total (n=172)	90	8	0	54	0	8	0	4

n - número de isolados de cada espécie.

r - resistente

i - intermediário

Antibióticos: rifampicina (RIF), eritromicina (ERI), norfloxacin (NOR) e ciprofloxacina (CIP).

DISCUSSÃO

Isolamento do gênero Enterococcus

Dos 243 isolados com confirmação presuntiva para enterococos e submetidos ao PCR para o gene *tuf*, 63 não apresentaram resultado confirmatório, sendo classificados como não-enterococos. Este resultado negativo já era previsto para uma ocorrência de aproximadamente 10% dos isolados analisados, porém o número encontrado dentre as amostras foi mais alto, representando cerca de 26% do total de isolados obtidos.

Embora os testes seletivos utilizados para o isolamento de enterococos sejam considerados eficientes, já são reconhecidos cocos gram-positivos menos comumente encontrados, mas que podem exibir reações positivas aos testes de crescimento em Ágar Bile Esculina e em BHI contendo 6,5% de NaCl como os *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* spp. (3). Autores já afirmaram que não é possível realizar a distinção com base apenas em critérios fenotípicos de enterococos e outros cocos gram-positivos catalase negativos (23), com exemplos já citados acima. Logo a ocorrência de cocos gram-positivos pode ser considerada comum e mais investigações são necessárias para confirmação da espécie ou espécies encontradas com relativamente alta ocorrência nas amostras de fezes de lagartas de *H. erato phyllis*, principalmente na localidade de São Francisco de Paula/RS, em que o número de não-enterococos encontrados chegou a 65%, 30 dentre os 46 isolados obtidos.

Identificação das espécies

No presente estudo, bactérias do gênero *Enterococcus* foram isoladas de amostras de fezes de imaturos de *H. erato phyllis*. Em estudos anteriores já foi relatada a presença deste gênero em amostras de fezes de mamíferos (71%), répteis (86%) e aves (32%) (24). Apesar destas bactérias serem pesquisadas, muitas vezes, em amostras de interesse clínico ou em animais de sangue quente, um número crescente de trabalhos têm sido realizados com enfoque direcionado para a microbiota de insetos (6-10, 25, 26). Os insetos são o clado animal mais diverso e abundante em número de espécies, nos hábitos ecológicos e em biomassa (6). A diversificação e o sucesso evolutivo dos insetos têm dependido em parte de suas relações com micro-organismos benéficos conhecidos por aprimorar dietas pobres em nutrientes, proporcionar proteção contra

parasitas e patógenos, afetar eficiência como vetores de doenças e governar sistemas reprodutivos (6).

Vários exemplos a respeito da ação benéfica de bactérias aos hospedeiros já foram relatados, como a presença de comunidades microbianas envolvidas na degradação da celulose em insetos que se alimentam de madeira (6); micro-organismos do TGI de insetos que produzem tanases, degradando taninos vegetais, aumentando a disponibilidade de proteínas aos insetos que ingerem estes tipos vegetais, além de em certos casos ocasionar o aumento da resistência do hospedeiro devido à colonização do intestino por comunidades microbianas mutualísticas que, devido à competição por nutrientes, ocupação do nicho ou estímulo à resposta imune, aumenta a resistência do hospedeiro contra a invasão de parasitas (6).

Apesar do interesse crescente nos benefícios que a microbiota proporciona a seus hospedeiros, ainda existem lacunas no conhecimento a respeito do potencial impacto destes micro-organismos na ecologia e evolução de borboletas (7), além de poucos estudos relacionados a comunidades microbianas que ocorrem no gênero *Heliconius* (Lepidoptera – Nymphalidae).

A colonização microbiana do TGI de insetos apresenta frequentemente habitats instáveis devido ao processo de ecdise, no qual é perdido o revestimento de exoesqueleto, ocasionando a perda do revestimento do intestino anterior e posterior, interrompendo ou eliminando total ou parte de populações bacterianas presentes (6); em *H. erato phyllis* ocorrem cinco estádios na fase larval, nos quais ocorre o processo de muda. Além da ecdise, insetos holometábolos como as borboletas têm uma remodelação radical do intestino e outros órgãos durante a metamorfose, além das alterações de herbivoria para alimentação por pólen como no caso de *Heliconius*, os quais afetam diretamente a comunidade microbiana presente.

Alterações na composição de comunidades bacterianas em imaturos e adultos já foram observadas em *Heliconius*, e esta alteração pode ocorrer devido a diferenças na nutrição e composição química das dietas nestes estágios de vida, as quais podem selecionar diferentes taxa microbianos que se adaptam de forma mais eficiente em lagartas e adultos, e devido às alterações da morfologia interna e das condições físico-químicas decorrentes da metamorfose (7). O mesmo estudo demonstra através de experimentos que não existe diferença significativa na composição dos micro-organismos presentes nas fezes e nas lagartas em si (que as produziram), indicando que as comunidades microbianas são mantidas em suas fezes, possibilitando que as mesmas possam ser utilizadas em estudos que abordam a presença de micro-organismos em lagartas de modo não destrutivo.

Os resultados do presente estudo demonstram a presença de três espécies de enterococos (*E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *E. faecalis*) dentre as quatro espécies testadas em fezes de lagartas de *H. erato phyllis*. Estes resultados corroboram com trabalhos anteriores que indicam a prevalência deste gênero em todos os estágios de vida de *Heliconius erato*, além da diferença na ocorrência de espécies quando comparado a isolados clínicos e de animais de sangue quente (7). A elevada ocorrência de *E. casseliflavus* (74%), seguida de *E. mundtii* (18%) nas amostras analisadas difere do que é encontrado para animais de sangue quente, porém, apesar de apresentar uma grande prevalência no presente estudo, está de acordo com trabalhos anteriores que relatam uma maior ocorrência de *E. casseliflavus*, representando 44% dos 37 taxa de insetos analisados (26); apesar de *E. faecalis* também ter sido encontrado no estudo citado anteriormente, os autores sugerem que a ocorrência desta espécie não é comensal já que *E. faecalis* não ocorreu em amostras coletadas em determinado período do ano.

O presente estudo descreve uma baixa ocorrência de *E. faecalis* (1%), e não ocorrência de *E. faecium* nas amostras pesquisadas. É possível supor que a grande prevalência das demais espécies (*E. casseliflavus* e *E. mundtii*) esteja diretamente ligada à alimentação herbívora dos imaturos, em que as Passifloráceas consumidas atuariam como fonte destas bactérias neste estágio de vida.

Estabelecimento da microbiota nos imaturos

Devido à perda do revestimento do intestino anterior e posterior durante a ecdise dos estádios larvais e da inexistência de contato da fêmea com os ovos após a sua postura, o estabelecimento destas bactérias no TGI das lagartas de borboleta está muito provavelmente associado à sua dieta herbívora. A dieta pode impactar diretamente a microbiota dos diferentes estágios de vida através da disponibilidade de diferentes nutrientes, diferente composição química e possivelmente diferente seleção de microorganismos devido à atividade antimicrobiana (7).

Um dos primeiros trabalhos que encontrou associação entre enterococos e vegetação terrestre foi publicado em 1961; o autor relatou a presença de enterococos em flores e brotos de diversas espécies de plantas, e inicialmente sugeriu que estas bactérias ocorriam de forma sazonal, sendo populações transitórias que eram provavelmente introduzidas por insetos e pelo vento (27). Em outro estudo, o mesmo autor demonstrou a capacidade de *E. faecalis* crescer em plantas e posteriormente em 1963 inferiu com evidências mais conclusivas de que, em geral, o gênero *Enterococcus* está associado a plantas (28, 29). A ocorrência do gênero *Enterococcus* também já foi relatada para plantas forrageiras, com identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii* e *E. casseliflavus* (30).

Os imaturos de *H. erato phyllis* se alimentam de passifloráceas, e as lagartas utilizadas no presente estudo foram alimentadas somente com a espécie *Passiflora suberosa*. É possível que, durante o desenvolvimento da lagarta, bactérias do gênero *Enterococcus* tenham se estabelecido no TGI destes animais através do alimento ingerido no decorrer do crescimento e das sucessivas mudas, resultando em amostras de fezes com presença destes micro-organismos. Alguns trabalhos relatam a produção de substâncias antifúngicas e antimicrobianas em algumas espécies do gênero *Passiflora*, como *P. mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. maliformis* e *P. edulis* (31, 32), logo uma interessante abordagem para trabalhos futuros seria a investigação de enterococos em fezes de lagartas alimentadas com diferentes plantas hospedeiras, a fim de que inferências mais conclusivas possam ser feitas em relação à presença deste gênero em *Heliconius* estar relacionada ao consumo da planta hospedeira. Além disso, estudos com lagartas da natureza são necessários, a fim de que possam ser realizadas comparações entre a microbiota encontrada em animais criados em laboratório e animais em seu ambiente natural. Diferenças entre a comunidade microbiana presente em adultos de *Heliconius erato* criados em condições artificiais e naturais já foram demonstrados, reforçando a ideia da necessidade de pesquisas futuras utilizando animais provenientes de condições naturais para estudo comparativo (7).

Outra hipótese sobre a fonte de aquisição da microbiota em imaturos de *H. erato phyllis* e da prevalência do gênero *Enterococcus* tanto em lagartas quanto em adultos é a transferência de micro-organismos da fêmea para a prole durante a postura dos ovos. Para insetos que possuem bactérias simbiotes obrigatórias, as mesmas podem auxiliar no desenvolvimento e até mesmo na aquisição de nutrientes, sendo que estas associações ocorrem muitas vezes em insetos sociais ou gregários como abelhas e

cupins (6), já que a transmissão de comunidades microbianas nestes organismos se dá de forma mais facilitada.

Em abelhas (*Apis mellifera*), bactérias simbiontes presentes no TGI de adultos são adquiridas através de interações sociais com outras abelhas operárias adultas da colônia (6); nestes organismos, a transmissão vertical através de sociabilidade pode facilitar a coevolução e o surgimento de uma microbiota específica para o hospedeiro. A transferência vertical de bactérias do TGI em insetos não sociais não é bem explicada; sabe-se que em insetos gregários como baratas e grilos, os quais não possuem cuidado parental, a transmissão de bactérias ocorre durante a alimentação em locais comuns à defecação (6).

Um dos melhores exemplos de transmissão de microbiota em insetos durante a postura dos ovos é o que ocorre em *Megacopta punctatissima* (Plataspidae) (6); estes insetos possuem o simbiote *Ishikawaella capsulata* em regiões especializadas no lúmen do intestino médio do hemíptero, o qual é transmitido da fêmea para seus ovos através da deposição de uma cápsula junto à postura dos ovos, que é ingerida pelos juvenis imediatamente após a eclosão (6, 33). Não é descrito nenhum mecanismo semelhante para transmissão de bactérias do TGI em borboletas do gênero *Heliconius*, porém a transmissão através de bactérias presentes no exterior do córion do ovo ou na substância que auxilia a fixação dos ovos na superfície das folhas pode representar uma possível via de transmissão, já que a ingestão de parte do córion é indispensável para que as lagartas possam eclodir, além de muitas vezes ingerirem quase totalmente o córion, a fim de que os nutrientes sejam reaproveitados pelos imaturos de primeiro estágio. Estudos que busquem a ocorrência ou não de micro-organismos em ovos ou mesmo no córion de ovos de *H. erato phyllis* são desejáveis a fim de que questões como estas possam ser melhor respondidas.

Um método capaz de avaliar a relação filogenética das espécies presentes nas fezes de imaturos de *H. erato phyllis* é a técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), determinada como a técnica ouro para tipagem de enterococos, a qual poderia avaliar uma relação clonal entre as espécies encontradas. Caso o resultado desta técnica demonstrasse que todos os *E. casselifavus*, por exemplo, isolados das fezes de imaturos da fêmea HEAB2 fossem clones, e que estes diferissem dos isolados de *E. casselifavus* da fêmea HEV2, poderíamos inferir que a microbiota do TGI das lagartas foi transferida da fêmea para a prole através do córion do ovo, com proles provenientes de mães diferentes apresentando cepas distintas; por outro lado, caso os *E. casselifavus* isolados de fezes de lagartas de diferentes fêmeas fossem todos clones, poderíamos inferir que a microbiota dos imaturos foi adquirida através da alimentação, já que os mesmos foram alimentados com as mesmas plantas hospedeiras; além disso, não descarta-se a hipótese de que todos os isolados de *E. casselifavus* sejam cepas distintas.

Perfil de Resistência aos Antimicrobianos

Micro-organismos do gênero *Enterococcus* são conhecidos por apresentarem resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos de uso clínico e veterinário. A resistência intrínseca está presente no genoma destas bactérias (34); estes micro-organismos possuem resistência intrínseca à penicilina, ampicilina e baixas concentrações de aminoglicosídeos como a gentamicina e estreptomicina (3). A resistência adquirida ocorre através de mutações esporádicas, troca horizontal de genes através da transferência de plasmídeos ou mesmo através do movimento de transposons (34). A capacidade dos enterococos rapidamente adquirirem resistência aos demais antibióticos é motivo de preocupação, pois resulta em uma maior dificuldade no tratamento de enfermidades causadas por esta bactéria. Exemplos de resistência

adquirida incluem resistência à cloranfenicol, rifampicina, eritromicina, tetraciclina, altos níveis de aminoglicosídeos e à vancomicina (3).

Os enterococos isolados de fezes lagartas de *H. erato phyllis* do presente estudo não apresentaram resistência à maioria dos antimicrobianos testados, porém um grande número de *E. casseliflavus* foram resistentes a rifampicina (65%), seguido de resistência intermediária a eritromicina (38%). Além disso, apesar da baixa ocorrência de *E. faecalis* nas amostras analisadas, todos apresentaram resistência intermediária a rifampicina e eritromicina. É provável que a resistência observada nos *Enterococcus* aqui identificados seja classificada como resistência adquirida, porém estudos mais detalhados são necessários a fim de que seja investigada a ocorrência de possíveis genes de resistência a estes antibióticos nas cepas isoladas, caracterizando resistência intrínseca.

A rifampicina atua inibindo o crescimento bacteriano através da ligação à subunidade beta da RNA polimerase, evitando o início da transcrição (35). A resistência adquirida à rifampicina encontrada nos isolados do presente estudo já foi relatada e é relacionada muitas vezes ao uso deste antibiótico para tratamento de infecções causadas por outras bactérias que afetam aos enterococos presentes, ocasionando cepas resistentes (35); a resistência a rifampicina resulta de mutações em sítios específicos no gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, reduzindo a afinidade deste antibiótico à polimerase.

A Eritromicina é um antimicrobiano do grupo dos macrolídeos utilizado no tratamento de infecções humanas, sendo o antibiótico de primeira escolha em doentes alérgicos à penicilina (36). Este antimicrobiano atua inibindo a síntese proteica através da ligação à molécula 23S do RNAr, na subunidade 50S do ribossomo das bactérias. Sabe-se que determinados plasmídeos e transposons conferem aos enterococos

resistência adquirida à eritromicina e que o mecanismo de resistência envolve a metilação de um resíduo de adenina na molécula 23S do RNAr, frequentemente mediado pelo gene *erm(B)* (3).

A presença de resistência nos *Enterococcus* isolados no presente estudo foi provavelmente adquirida pelas bactérias, sendo que a ocorrência deste tipo de resistência a rifampicina e eritromicina pode ser considerada comum e já foi relatada em diversos trabalhos anteriores (37, 38). Estudos que investiguem a microbiota do TGI de imaturos provenientes do ambiente são desejáveis a fim de que possa ser melhor explicada a origem da resistência encontrada no presente estudo, além da investigação de possíveis genes de resistência nas cepas isoladas.

Conclusões

As espécies *E. casseliflavus*, *E. faecalis* e *E. mundtii* foram detectadas em fezes de imaturos de *H. erato phyllis* (Lepidoptera-Nymphalidae). Muitos estudos têm sido realizados com *H. erato phyllis* abordando aspectos ecológicos, genômicos e evolutivos desta borboleta, porém estudos que avaliam a composição da microbiota destes organismos ainda são escassos, sendo que a diversidade do gênero *Enterococcus* nesta espécie ainda não havia sido relatada. Este trabalho apresenta resultados que poderão ser incorporados em estudos posteriores referentes à avaliação da diversidade total de enterococos nestas borboletas, já que somente a ocorrência de quatro espécies relacionadas ao gênero foi avaliada.

A presença deste gênero de bactérias deve ser melhor estudada, já que sua prevalência foi constatada em todo o ciclo de vida de *Heliconius*, apesar da grande variação na alimentação, morfologia e hábitos de vida destas borboletas (7). O modo de

colonização através da alimentação, transferência da fêmea para a prole ou ambos e as possíveis funções que estas bactérias desempenham no TGI destas borboletas devem ser melhor investigados em estudos posteriores, a fim de que a relação de simbiose e até mesmo a história evolutiva destes organismos possa ser elucidada. O presente estudo utilizou somente amostras de animais que foram criados em condições de laboratório, logo não se descarta a possibilidade de que a aplicação desta metodologia utilizando amostras de animais em seu ambiente natural pode resultar em diferentes distribuições ou mesmo ocorrência das espécies de enterococos aqui pesquisadas. Como perspectivas futuras, será importante a investigação dos perfis e mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana, bem como a investigação dos fatores de virulência, pois estes estudos disponibilizam informações a respeito de interações e distúrbios ambientais nos habitats ocupados por estas borboletas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Aldo Mellender de Araújo pela orientação exemplar, disponibilidade, ensinamentos e amizade. À Ana Paula Guedes Frazzon pelos ensinamentos, pela co-orientação e suporte à realização de todas as análises da pesquisa. Aos integrantes do Laboratório de Genética Ecológica e Evolução que auxiliaram na criação das borboletas aqui utilizadas (Janaína de Nardin, Etiele de Senna Silveira, Pietro Pollo, Natasha Nonemacher Magni, Thiana Arisi, Vanessa Ferrer e Tiziane Molina), bem como aos integrantes do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde pela parceria durante todo o experimento e realização das análises. Às professoras Sueli Teresinha Van Der Sand e Fatima Menezes Bento pela permissão à utilização das capelas de fluxo laminar dos seus laboratórios e ao PPGMAA pela permissão ao uso do fotodocumentador durante as análises. Ao Cesar

Marcelo Caramês da Silva e a minha família pelo apoio, carinho e companheirismo durante a realização de todo o trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. Schleifer, KH, Kilpper-Bälz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 31–34.
2. Lebreton, F, Willems, RJL, Gilmore, MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. 2014. Em: Gilmore, MS, Clewell, DB, Ike, Y, Shankar, N. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>].
3. Murray, BE. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev. 3: 46–65.
4. Sherman, JM. 1937. The streptococci. Bacteriol. Rev. 1: 3–97.
5. Byappanahalli, MN, Neves, MB, Korajkic, A, Staley, ZR, Harwood, VJ. 2012. Enterococci in the environment. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76(4): 685–706. doi:10.1128/MMBR.00023-12.
6. Engel, P, Moran, NA. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol. Rev. 37: 699-735. doi:10.1111/1574-976.12025.
7. Hammer, TJ, McMillan, WO, Fierer, N. 2014. Metamorphosis of a butterfly associated bacterial community. PLoS ONE. 9(1) e86995. doi:10.1371/journal.pone.0086995.

8. Broderick, NA, Raffa, KF, Goodman, RM, Handelsman, J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 293–300. doi: 10.1128/AEM.70.1.293–300.2004
9. Brinkmann, N, Martens, R, Tebbe, CC. 2008. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7189–7196. doi:10.1128/AEM.01464-08.
10. Bucher, GE. 1963. Survival of populations of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder in the gut of *Galleria mellonella* (Linnaeus) during metamorphosis, and transmission of the bacteria to the filial generation of the host. *J. Insect Pathol.* 5: 336–343.
11. Jorge, LR, Cordeiro-Estrela, P, Klaczko, LB, Moreira, GRP, FREITAS, AVL 2011. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the Neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 102: 765–774. doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01610.x.
12. Briscoe, AD, Macias-Muñoz, A, Kozak, KM, Walters, JR, Yuan, F, Jamie, GA, Martin, SH, Dasmahapatra, KK, Ferguson, LC, Mallet, J, Jacquin-Joly, E, Jiggins, CD. 2013. Female behaviour drives expression and evolution of gustatory receptors in butterflies. *PLoS Genet.* 9(7): e1003620. doi:10.1371/journal.pgen.1003620.
13. Joron, M, Frezal, L, Jones, RT, Chamberlain, NL, Lee, SF, Haag, CR, Whibley, A, Becuwe, M, Baxter, SW, Ferguson, L, Wilkinson, PA, Salazar, C, Davidson, C, Clark, R, Quail, MA, Beasley, H, Glithero, R, Lloyd, C, Sims, S, Jones, MC, Rogers, J, Jiggins, CD, French-Constant, RH. 2011. Chromosomal

- rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry. *Nature*. 477: 203-206. doi:10.1038/nature10341.
14. Counterman, BA, Araujo-Perez, F, Hines, HM, Baxter, SW, Morrison, CM, Lindstrom, DP, Papa, R, Ferguson, L, Joron, M, Ffrench-Constant, RH, Smith, CP, Nielsen, DM, Chen, R, Jiggins, CD, Reed, RD, Halder, G, Mallet, J, McMillan, WO. 2010. Genomic Hotspots for Adaptation: The Population Genetics of Müllerian Mimicry in *Heliconius erato*. *PLoS Genet*. 6(2): e1000796. doi:10.1371/journal.pgen.1000796.
 15. Brown, KS. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 427–456.
 16. Ramos, RR, Freitas, AVL. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *J Lepid Soc.* 53:11–21.
 17. Donato, ST, Sidrim, JJC. 2007. Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente a Biologia Molecular em identificações discrepantes. 86 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, Brasil.
 18. Ke, D, Picard, FJ, Martineau, F, Menard, C, Ménard, C, Roy, PH, Ouellette, M, Bergeron, MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3497–3503.
 19. Jackson, CR, Fedorka-Cray, PJ, Barrett, JB. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3558–3565. doi: 10.1128/JCM.42.8.3558–3565.2004.
 20. Sedgley, C, Nagel, A, Shelburne, CE, Clewell, DB, Appelbe, O, Molander, A. 2005. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol.* 50: 575–583. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.10.017.

21. Cheng, S, McCleskey, FK, Gress, MJ, Petroziello, JM, Liu, R, Namdari, H, Beninga, K, Salmen, A, DelVecchio, VG. 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 35(5): 1248–1250.
22. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement M100–S22. Wayne, PA: CLSI.
23. Devriese, LA, Pot, B, Collins, MD. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399–408.
24. Mundt, JO. 1963. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *J. Appl Microbiol.* 11(2): 136–140.
25. Dillon, RJ, Dillon, VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71–92. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416.
26. Martin, JD, Mundt, JO. 1972. Enterococci in insects. *J Appl Microbiol.* 24(4): 575–580.
27. Mundt, JO. 1961. Occurrence of enterococci: bud, blossom, and soil studies. *J. Appl Microbiol.* 9: 541–544.
28. Mundt, JO, Coggin, JH, Johnson, LF. 1962. Growth of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* on plants. *J. Appl. Microbiol.* 10: 552–555.
29. Mundt, JO. 1963. Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *J. Appl. Microbiol.* 11: 141–144.
30. Cai, Y. 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 82: 2466–2471. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75498-6.

31. Birner, J, Nicolls, JM. 1973. Passicol, antibacterial and antifungal agent produced by *Passiflora* plant species: preparation and physicochemical characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 105–109.
32. Ramaiya, SD, Bujang, AS, Zakaria, MH. 2014. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *ScientificWorldJournal.* 1-10. doi: 10.1155/2014/167309.
33. Hosokawa, T, Kikuchi, Y, Nikog, N, Shimada, M, Fuaktsu, T. 2006. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol.* 4: e337. : doi: 10.1371/journal.pbio.0040337.
34. Hollenbeck, BL, Rice, LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* 3:5 421-433. doi: 10.4161/viru.21282.
35. Lebreton, F, Willems, RJL, Gilmore, MS. 2014. Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance. Em: Gilmore, MS, Clewell, DB, Ike, Y, Shankar, N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>].
36. Garrido AM, Galvez, A, Pulido, RP. 2014. Antimicrobial resistance in Enterococci. *J Infect Dis Ther.* 2:150. doi: 10.4172/2332-0877.1000150.
37. Ahmad A, Ghosh A, Schal C, Zurek L. 2011. Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiol.* 11:23. doi: 10.1186/1471-2180-11-23.
38. Goldstein, BP. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *J. Antibiot.* 67: 625-630. doi:10.1038/ja.2014.107.