

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

***Escherichia coli* E *Salmonella* sp. EM SUIFORMES NATIVOS E
EXÓTICOS ASSINTOMÁTICOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO
ESTADO DE GOIÁS**

Adriana Marques Faria
Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA
2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: ADRIANA MARQUES FARIA

Título do trabalho: ***Escherichia coli* E *Salmonella* sp. EM SUIFORMES NATIVOS E EXÓTICOS ASSINTOMÁTICOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO ESTADO DE GOIÁS**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 06 / 01 /2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

ADRIANA MARQUES FARIA

***Escherichia coli* E *Salmonella* sp. EM SUIFORMES NATIVOS E
EXÓTICOS ASSINTOMÁTICOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO
ESTADO DE GOIÁS**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de
Alimentos

Linha de Pesquisa:

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico
e controle das doenças infecciosas e
parasitárias
dos animais.

Orientador:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Comitê de orientação:

Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora de Andrade

Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Marques Faria, Adriana

Escherichia coli e Salmonella sp. em suiformes nativos e exóticos assintomáticos de criações comerciais do Estado de Goiás [manuscrito] / Adriana Marques Faria. - 2016.
x, 47 f.

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares; co orientador Maria Auxiliadora Andrade; co-orientador Moema Pacheco Chediak Matos.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Enterobacteriaceae. 2. PCR. 3. Pecari tajacu. 4. Sus scrofa scrofa. 5. Tayassu pecari. I. Fontgalland Coelho Linhares, Guido , orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO **239** DE DEFESA DE TESE DE **DOCTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Adriana Marques Faria**. Às
4 **09h00min** do dia **06/12/2016**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Adriana**
8 **Marques Faria**, intitulada "**Escherichia coli e Salmonella sp. em suiformes não domesticados**
9 **em criações comerciais no Estado de Goiás**", apresentada para obtenção do **Título de Doutor em**
10 **Ciência Animal**, junto à Área de Concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de**
11 **Alimentos** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Prof. Dr. Guido Fontgalland**
12 **Coelho Linhares**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Adriana**
13 **Marques Faria** para exposição em **cinquenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor
14 Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a
15 arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo
16 igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu
17 nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o
18 (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

19 Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Aprovada

20 Profa. Dra. Virginia Santiago Silva - Embrapa

Aprovada

21 Profa. Dra. Adriana Silva Santos

Aprovada

22 Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes

Aprovada

23 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto

Aprovada

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a)

25 **Adriana Marques Faria**, habilitada [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)]

26 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33 _____
34 _____
35 _____
36 _____
37 _____

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39 *Escherichia coli e Salmonella sp. em suínos nativos*
40 *e exóticos assintomáticos de criações comerciais*
41 *do estado de Goiás*
42 _____
43 _____
44 _____

45 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares**, lavrei a presente
46 ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

47 Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares
48 Profa. Dra. Virgínia Santiago Silva - Embrapa
49 Profa. Dra. Adriana Silva Santos
50 Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes
51 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto

Guido
Virgínia Santiago Silva
Adriana S. Santos
Dunya Mara Cardoso Moraes
Osvaldo José da Silveira Neto

À minha família e amigos presentes
em todos os momentos importantes,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o carinho, suporte e ajuda que me foi concedida, não só durante a confecção desse trabalho, mas sempre que me foi necessário. Em especial à minha filha, Stella, que sempre entende as minhas ausências e me recebe de braços abertos e o sorriso mais perfeito no rosto;

Aos meus amigos e colegas de profissão Lorena, Itallo, Thiago, Ana Maria, Samantha e Dunya que estiveram presentes e ajudaram imensamente na confecção deste trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares, pelo carinho, paciência e ensinamentos constantes;

Às minhas co-orientadoras, Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora de Andrade, exemplo de dedicação e conhecimento infindáveis na área de microbiologia, e Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos sempre me guiando na patologia veterinária;

Aos técnicos, Winder e Maria Auxiliadora Leão por auxiliar nas dúvidas e dificuldades nos protocolos de diagnóstico no Setor de Medicina veterinária preventiva;

Aos proprietários dos animais utilizados neste experimento por conceder prontamente as propriedades para a realização das coletas essenciais ao desenvolvimento deste trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Terezinha Knobl da Universidade de São Paulo pelas amostras de referencia de *Escherichia coli*;

À Fundação Oswaldo Cruz pela sorotipificação de *Salmonella*;

À CAPES pela bolsa fornecida durante todo o período do doutorado;

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela formação profissional e por ter me abrigado durante tanto tempo; À coordenação da Pós-graduação pelas boas condições fornecidas para a realização deste estudo.

A todos vocês e muitos outros mais, um agradecimento sincero e de coração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Subordem <i>Suiformes</i>	2
2.2 Bactérias: Família <i>Enterobacteriaceae</i>	6
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.2 <i>Salmonella</i> sp.	10
2.3 Considerações sobre resistência aos antimicrobianos.....	12
Referências	14
CAPÍTULO 2- <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella</i> sp. EM <i>Tayassu pecari</i> E <i>Pecari tajacu</i> , SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA.....	20
Resumo	20
Abstract	20
Introdução	21
Materiais e métodos	22
Resultados	25
Discussão	27
Conclusão	29
Referências	29
CAPÍTULO 3 – <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella</i> sp. EM <i>Sus scrofa scrofa</i> , SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E GENES DE VIRULÊNCIA.....	32
Resumo	32
Abstract	32
Introdução	33
Materiais e métodos	34
Resultados	38
Discussão	40
Conclusão	42
Referências	43
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
ANEXOS.....	47

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Representação esquemática da Subordem Suiformes, indicando a presença de um ancestral comum entre seus representantes existentes em todos os continentes do globo	3
FIGURA 2 - Fotos de exemplares típicos da Subordem Suiformes: queixada (<i>Tayassu pecari</i>), javali (<i>Sus scrofa scrofa</i>), cateto (<i>Pecari tajacu</i>).....	5
FIGURA 3 - Fotomicrografia eletrônica de bactérias da Família <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>E. coli</i> (A) e <i>Salmonella</i> sp. (B).....	7

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Resultados de testes de suscetibilidade à antimicrobianos de <i>E. coli</i> isoladas de <i>P. tajacu</i> e <i>T. pecari</i>	26
--	----

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Resultados de testes de suscetibilidade à antimicrobianos de <i>E. coli</i> isoladas de <i>S. scrofa</i>	39
---	----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

QUADRO 1 - Primers usados para detecção de genes de virulência e resistência de <i>E. coli</i> pela técnica de PCR e referências	24
QUADRO 2 - Resultados positivos para genes de virulência e presença de hemolisina em <i>E. coli</i> isoladas de <i>T. pecari</i> e <i>P. tajacu</i>	27

CAPÍTULO 3

QUADRO 1 - Primers usados para detecção de genes de virulência e resistência de <i>E. coli</i> pela técnica de PCR e referências	37
QUADRO 2 - Primers usados para detecção de genes de virulência e resistência de <i>Salmonella</i> pela técnica de PCR em tempo real e referências	38
QUADRO 3 - Resultados positivos dos genes de virulência de <i>E. coli</i> isoladas <i>S. scrofa</i>	40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de <i>E. coli</i> em <i>P. tajacu</i>	25
TABELA 2 - Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de <i>E. coli</i> em <i>T. pecari</i>	26

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de <i>E. coli</i> em <i>S. Scrofa</i>	39
--	----

RESUMO

A proximidade de animais silvestres com animais domésticos e seres humanos pode resultar no aparecimento de doenças comuns a estes três grupos, incluindo doenças zoonóticas. O estudo de bactérias e doenças que acometem animais silvestres é importante para atuar na forma de controle epidemiológico e vigilância sanitária, visto que não se compreende o papel destes animais na transmissão de doenças entre outros animais silvestres, exóticos e domésticos. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de pesquisar a presença das bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em suabes retais provenientes de Suiformes não domesticados em criações comerciais no Estado de Goiás. Foram colhidos suabes retais de 100 *Sus scrofa scrofa*, 60 de *Tayassu pecari* e 30 de *Pecari tajacu*, de diferentes faixas etárias. À partir do material colhido fez-se o isolamento, perfil antimicrobiano, teste de hemólise para *E. coli* e detecção de genes de virulência e de resistência das bactérias. Para a detecção dos agentes, foi realizado exame bacteriológico convencional e ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos. Foi realizada a tipificação sorológica por teste sorológico com soro polivalente anti-O para a bactéria *Salmonella* e detecção de genes virulência e de resistência pela técnica de PCR nos isolados. Os resultados obtidos demonstraram altas taxas de resistência aos antimicrobianos e presença de genes de virulência em amostras de *E. coli* em todos os grupos testados. O isolamento de *Salmonella* sp. foi possível em uma amostra de *S. scrofa*, que apresentou também altas taxas de resistência à antimicrobianos, mas não houve detecção de genes de virulência ou de resistência neste isolado. Conclui-se que: nesta condição de criação *Salmonella* sp. não é isolada comumente de *T. pecari* e *P. tajacu*, sendo isolada em baixa frequência de *S. scrofa*; e que *E. coli* é isolada de *S. scrofa*, *T. pecari* e *P. tajacu* em rebanhos comerciais do Estado de Goiás, com múltiplos padrões de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Enterobacteriáceas, PCR, *Pecari tajacu*, *Sus scrofa scrofa*, *Tayassu pecari*.

ABSTRACT

***Escherichia coli* AND *Salmonella* sp. IN NATIVE AND EXOTIC ASYMPTOMATIC SUIFORMES FROM COMERCIAL HERDS IN GOIÁS STATE**

The closeness between wild and domestic animals with humans may result in common diseases involving these three groups, including zoonotic and antropozoonotic diseases. The study of bacteria and disease that affects animals is an important way to approach epidemiologic control and sanitary vigilance, as we do not understand the roll of wild animals in transmitting diseases among wild, exotic and domestic animals. The main objective of the present study was to search the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. from rectal swabs of non-domesticated Suiformes in Commercial herds in Goiás State. It was collected rectal swabs of 100 *Sus scrofa scrofa*, 60 *T. pecari* and 30 *P. tajacu*, from different ages. The samples were used in order to obtain the isolation, antimicrobial profile, hemolisin test for *E. coli* and virulence and resistance gene presences in both bacteria. The serotyping was performed with polyvalent anti-O serum and the virulence and resistance gene deteccion by PCR technique. The results shown high rates of antimicrobial resistance and virulence and resistance genes in analyzed groups of *E. coli*. The isolation of *Salmonella* sp. occurred in one sample of *S. scrofa*, with high rates of antimicrobial resistance also, but no resistance and virulence genes were detected in this isolate. We must pay attention to the possibility of horizontal gene transference of virulence factors and resistance trough contaminated water and food, that may transform commensal bacteria in possible pathogenic agents. It is conclude: that *Salmonella* sp. is not commonly isolated from *T. pecari* and *P. tajacu*, showing low frequency of isolation in *S. scrofa* in these conditions; and *E. coli* with multidrug resistance patterns is isolated from *S. scrofa*, *T. pecari* and *P. tajacu* in commercial herds from Goiás State.

Key-words: Enterobacteriaceae, PCR, *Pecari tajacu*, *Sus scrofa scrofa*, *Tayassu pecari*

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

Os Suiformes representam importantes elementos de biodiversidade, em que várias espécies possuem grande importância econômica e cultural. Este grupo de animais possui uma abrangência geográfica considerável e atuam como indicadores positivos de conservação de vida selvagem, e também atuam como hospedeiros de várias patógenos que podem ser compartilhados entre animais e seres humanos¹.

Animais silvestres podem apresentar amplo raio de circulação, representando portanto riscos de difícil previsão a outras populações animais, tais como os animais de produção. Nesta conjuntura, convém pesquisar quais possíveis patógenos podem estar presentes em animais silvestres e exóticos, que ainda que em ambiente diferente do habitat natural, são representativos a situações de risco para o âmbito agropecuário e de saúde pública.

Salmonella enterica e *Escherichia coli* são agentes patogênicos comuns a vários animais e inclusive humanos, sendo portanto temas de relevância em saúde pública e animal em todo o mundo². Informações a respeito da patogenicidade das bactérias pode acrescentar conhecimentos que nos inteiram sobre o controle de doenças infecciosas³. É fato que estas bactérias atuam como contaminantes importantes em água e alimentos, sendo portanto, de difícil controle na criação e produção animal. A presença de *Salmonella* sp. pode ser determinante de um prognóstico reservado e de difícil controle dentro de uma propriedade. E a presença de *E. coli* com múltipla resistência a antimicrobianos e presença de vários fatores de virulência é uma situação bastante alarmante

As populações bacterianas existentes no intestino são diversificadas e complexas. As bactérias existem em microhabitats específicos e nichos metabólicos que são definidos pelo hospedeiro, por aspectos nutricionais e pela microbiota existente. Uma colonização intestinal de sucesso compõe-se de vários fatores incluindo a aderência da bactéria às células intestinais, produção de toxinas e aquisição de ferro⁴.

A crescente problemática de agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos e com acentuada virulência é uma realidade mundial nos dias de hoje. Bactérias da família *Enterobacteriaceae* demandam muitos estudos para entender os métodos de ação e sua patogenicidade inerente aos homens e animais. Quando se estuda os patógenos bacterianos, é possível descobrir que estes possuem múltiplos fatores que em conjunto são essenciais à capacidade de infectar e causar injúria em seus hospedeiros.

A utilização de forma intensiva e sem prescrição de antimicrobianos em conjunto com a contaminação de água e solos incide em altas taxas de resistência, sendo que animais com pouco ou nenhum contato com humanos e animais domesticados já apresentam bactérias com multirresistência, fato este de bastante relevância em saúde pública e animal².

Estudos que abrangem a vigilância epidemiológica a respeito da presença de enterobactérias auxiliam na compreensão de seu comportamento patogênico e promoção de resistência a antimicrobianos^{5,6}. Os Suiformes estão presentes em ambientes que fazem interface com os meios urbano, rural e silvestre, e a pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* nestes animais auxilia na compreensão do risco que representam à outros animais e aos seres humanos como transmissores e carreadores dessas bactérias.

Na medicina veterinária consegue-se alcançar múltiplas áreas que em conjunto determinam um equilíbrio determinante de ecossistemas onde vivem animais, ser humano e microrganismos. Elementar na produção de alimentos e controle de doenças, o médico veterinário compõe um profissional importante na sociedade e em saúde pública⁷.

2. Revisão de literatura

2.1 Subordem Suiformes

Na subordem Suiformes estão presentes espécies de interesse biológico e valor econômico. A sua interação com humanos e consequente domesticação datam do início das civilizações fazendo parte de seu crescimento e evolução econômica e cultural⁸.

As espécies de Suiformes existentes possuem milhões de anos de evolução histórica e apresentam muitas variações morfológicas e de tamanho, associadas às adaptações aos seus habitats naturais de acordo com sua distribuição global. A subordem em questão inclui famílias distintas, porém, relacionadas: Hippopotamidae (hipopótamos), Tayassuidae (pecaris), e Suidae (porcos)⁹. Apesar de originados de um ancestral comum, suídeos e taiassuídeos seguiram caminhos diferentes na linha evolutiva: taiassuídeos nas Américas e suídeos na África e Eurásia¹⁰ (Figura 1).

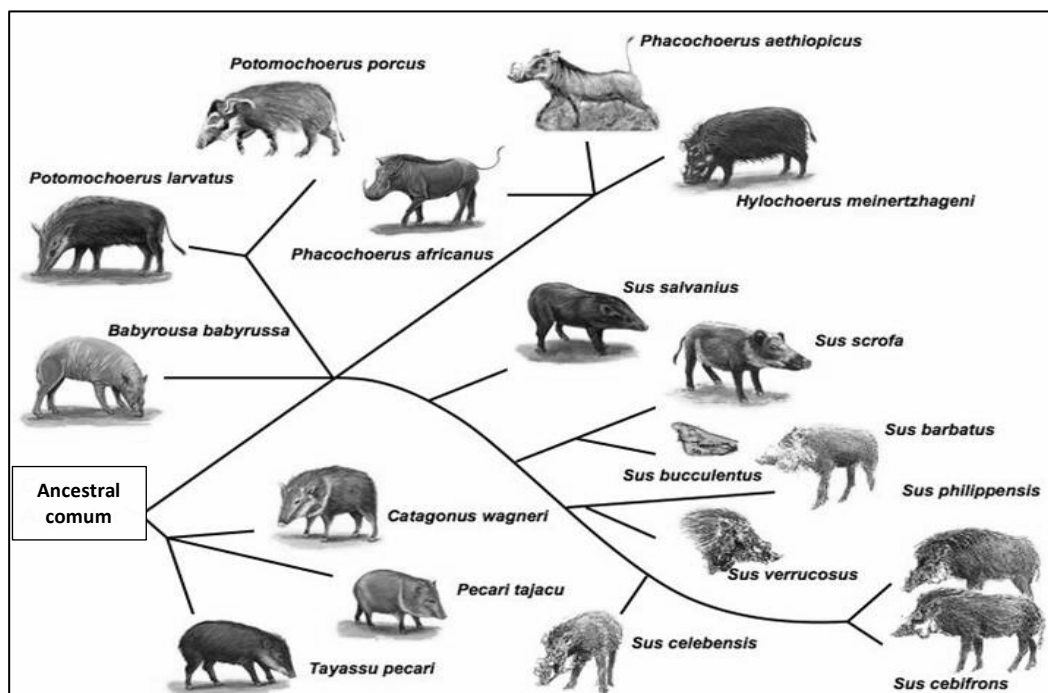


FIGURA 1 - Representação esquemática da subordem Suiformes, indicando a presença de um ancestral comum entre seus representantes existentes em todos os continentes do globo.

Fonte: Adaptado de Chen et al.¹¹

Os suínos (*Sus scrofa domesticus*) apareceram na terra há mais de 40 milhões de anos. Sua domesticação, antes creditada ao chineses, remonta há mais de 10.000 anos atrás em aldeias do leste da Turquia. A espécie evoluiu a partir do javali selvagem, embora haja controvérsia quanto à espécie exata: há quem acredite que descendem de *S. scrofa*, javali que habitava grandes regiões da Europa, e também quem acredite que sua origem é o *S. vittatus*, que vivia em grandes quantidades na Ásia e na bacia do Mar Mediterrâneo. Os suínos chegaram ao continente americano na segunda viagem de Colombo, que os trouxe em 1494 e soltou-os na selva na região da América Central. Em 1499, já existiam em números expressivos capazes de prejudicar plantações em todo continente americano, seus descendentes chegaram a povoar parte da América, abrangendo países como Estados Unidos da América (EUA), Equador, Peru, Colômbia, Venezuela e Brasil¹².

O javali é um porco selvagem, que foi introduzido em diversas regiões do mundo como animal de criação para consumo. Os primeiros registros do javali-europeu (*Sus scrofa*) na América do Sul datam de 1904 e 1906, ocasião em que alguns indivíduos foram trazidos da Europa para a província de La Pampa, na Argentina¹².

No Brasil, a presença de grupos de javalis asselvajados é registrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Bahia, Acre e Rondônia, além do grande número de criadouros

clandestinos em praticamente todos os estados brasileiros. Nos anos de 1996 e 1997 foram realizadas importações de javalis originários da Europa e do Canadá, destinados para criadouros no país. A falta de estrutura e conhecimento sobre a biologia do animal permitiu o escape deles para os ambientes silvestre e rural, proporcionando o surgimento de vários problemas ambientais e até de saúde pública¹³.

O javali, bem como seus respectivos cruzamentos com porcos domésticos, é a única espécie no Brasil na qual se permite a caça (abate como forma de manejo controlado), mas o transporte de javalis capturados vivos não é permitido e a sua comercialização ou a doação de quaisquer produtos à partir destes animais é proibida pela legislação sanitária e ambiental brasileira. Os criatórios comerciais desta espécie foram reduzidos e desde a década de noventa não é permitida a abertura de novos criatórios de javalis^{14, 15}.

Em diversos países da Ásia e Europa, bem como nos E.U.A. a presença de extensas populações de javalis é uma situação preocupante, principalmente pelo potencial carreador de patógenos de grande importância em saúde pública¹ como bactérias e vírus^{16,17}. No Brasil a dificuldade do controle de javalis também é tema de discussões entre pesquisadores e produtores agropecuários, principalmente porque não existem predadores naturais para estes animais, sendo que o clima e a extensa área geográfica favorecem a permanência e proliferação dessa espécie no país^{18,19,20}. A partir de tal problemática foi criado o Plano Nacional de prevenção controle e monitoramento do javali em estado asselvajado no Brasil¹⁴.

A família Tayassuidae é composta por três gêneros diferentes, *Catagonus* (pecari do Chaco), *Pecari* (cateto) e *Tayassu* (queixada), dessas apenas as duas últimas ocorrem no Brasil. Atualmente existem três espécies de catetos, *P. tajacu* existente na América do Sul, *P. angulatus* na América do Norte e *P. crassus* na América Central e México²¹.

Entre os taiassuídeos, o cateto (*Pecari*) é o de maior distribuição geográfica, ocorrendo do Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina¹⁰. O queixada (*T. pecari*) possui habitat mais restrito existindo em países das Américas do Sul e Central, sendo encontrado preferencialmente em regiões quentes e úmidas, próximas a cursos d'água. Ambos taiassuídeos e suas possíveis espécies podem ocorrer simultaneamente em várias regiões de forma simpátrica^{22, 23}.

Os catetos (*P. tajacu*) e queixadas (*T. pecari*) existente no Brasil, apesar de pertencerem a outra família, a Tayassuidae, possuem várias similaridades genotípicas e fenotípicas com a família Suidae que é representada pelo porco doméstico e pelo javali,²⁴ (Figura 2).

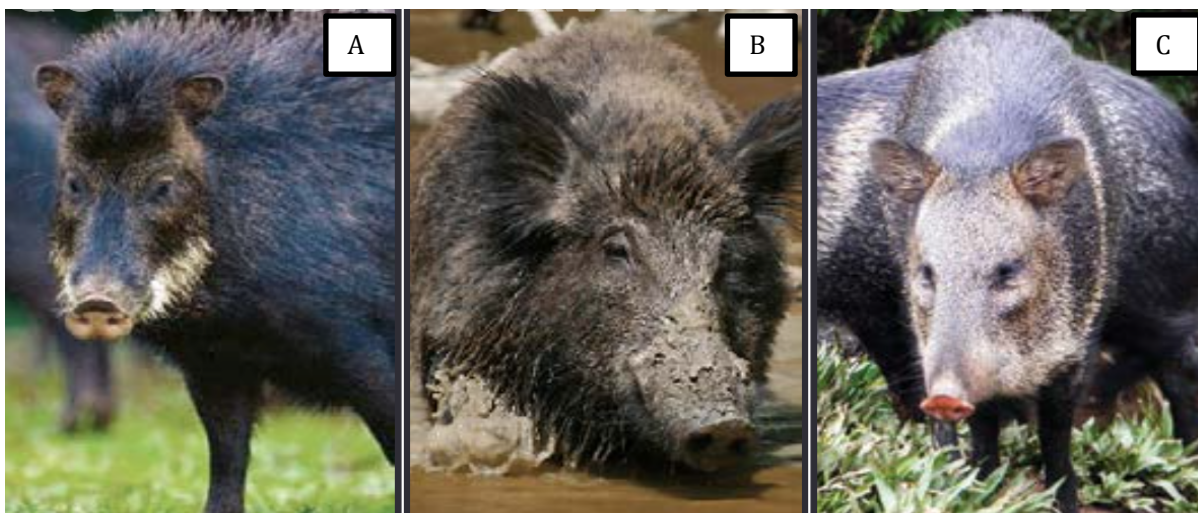


FIGURA 2 - Fotos de exemplares típicos da Subordem Suiformes: queixada (*Tayassu pecari*) (A), javali (*Sus scrofa scrofa*) (B), cateto (*Pecari tajacu*) (C).
 Fonte: Adaptado de Debert¹³

Os queixadas (*T. Pecari*) e catetos (*P. Tajacu*) são animais silvestres nativos, não podem ser abatidos, conforme Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998: “ É crime matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, ou em desacordo com a obtida”²⁵.

Os suiformes têm hábitos ambulantes que se estendem por diferentes biomas, sendo que muitas vezes os três gêneros presentes no Brasil podem ser encontrados dividindo o mesmo ambiente, ou ainda, disputando-o²⁶. A introdução nos biomas brasileiros de espécies de ungulados exóticas como os javalis ou asselvajamento de porcos domésticos altera de diversas formas o equilíbrio do ecossistema, muitas vezes causando desvios comportamentais em espécies como *T. pecari* e *P. tajacu*. A competição territorial entre estas espécies se torna óbvia em regiões com alto desenvolvimento agropecuário, onde há redução de vegetação natural e o contato entre tais animais passa a ser comum²⁶.

Muitos estudos demonstram que javalis, catetos e queixadas possuem patógenos em comum, tais como bactérias, vírus, protozoários e helmintos parasitas^{27,28,29,30,31}. Mesmo com a presença de tantas semelhanças entre as famílias *Tayassuidae* e *Suidae*, poucos estudos determinam quais agentes patogênicos estão presentes nestes animais e sua importância econômica e em saúde pública. Há a necessidade de elaborar pesquisas e diagnóstico de patógenos nestes animais para entender os riscos econômicos e sanitários implícitos em uma atividade em relação à outra³².

2.2 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* compreende um grupo filogenético relativamente homogêneo do Filo Gammaproteobacterias, consistindo em bacilos aeróbios facultativos, Gram negativos, não esporulantes, que são imóveis ou móveis por flagelação peritríquia³. O habitat natural destas bactérias é o trato gastrointestinal dos seres humanos e animais, sendo que estes organismos estão disseminados em vários locais podendo ser encontrados inclusive no ambiente. Muitas vezes, possuem estrutura antigênica complexa, diferentes fatores de virulência e podem produzir toxinas³³.

Habitantes naturais da microbiota intestinal, *Enterobacteriaceae* estão entre os mais comuns patógenos humanos, causando infecções tais como cistite e pielonefrite, septicemia, pneumonia, peritonites, meningite e outras infecções. As bactérias pertencentes à esta família tem uma propensão à rápida disseminação por fômites, água ou alimentos contaminados, e adquirem material genético por meio de transferência gênica horizontal, mediada por plasmídeos, *transposons* e bacteriófagos³⁴.

A replicação bacteriana ocorre basicamente por divisão celular simples, no entanto, a transferência de material genético pode ocorrer de duas formas distintas: transferência gênica vertical, onde os genes são passados de um microrganismo para seus descendentes; ou pela transferência horizontal, onde os genes podem ser adquiridos de outros microrganismos da mesma geração. A transferência gênica horizontal é um fenômeno que envolve uma célula doadora que contribui parte de seu genoma para uma célula receptora, que pode ser de espécie ou até mesmo de gênero diferente³⁵. Após a transferência, parte do DNA da bactéria doadora é incorporado ao DNA da bactéria receptora, dando origem a nova conformação genética⁴.

Salmonella e *Escherichia coli* (Figura 3) são bactérias intimamente relacionadas e compartilham um ancestral comum, que presume-se que fosse uma bactéria comensal do ambiente intestinal de animais³⁶. No entanto, contrariamente à maioria das cepas de *E. coli*, os membros do gênero *Salmonella* são geralmente patogênicos, tanto para humanos quanto para outros animais de sangue quente³, isso porque há milhões de anos *Salmonella* começou a acumular características virulentas pela aquisição de genes por transferência horizontal³⁶.

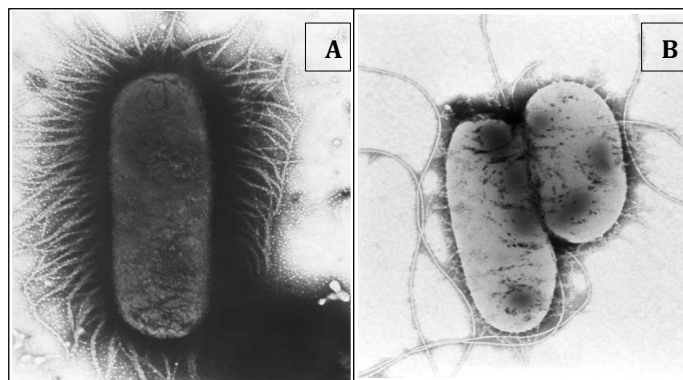


FIGURA 3 - Fotomicrografia eletrônica de bactérias da Família *Enterobacteriaceae*: *E. coli* (A) e *Salmonella* sp. (B)
Fonte: Wray & Wray³⁷

Alguns genes possuem funções necessárias à sobrevivência da bactéria, pois codificam proteínas funcionais para a respiração, locomoção e aquisição de nutrientes. Outros genes podem estar presentes para determinar funções que definem vantagens evolutivas e competitivas para o microrganismo, como invasão da célula hospedeira, resistência a determinados antimicrobianos e enterotoxinas, esses são denominados genes de virulência³⁸.

A sobrevivência da bactéria depende de um delicado balanço entre muitos produtos de genes atuando em conjunto para um funcionamento adequado do microrganismo. A ausência ou presença de certos genes está totalmente relacionada aos diversos mecanismos essenciais ou adaptativos às bactérias. Tais estruturas podem ser encontradas em plasmídeos ou no próprio cromossomo da bactéria. Os genes de virulência podem estar presentes em diversas regiões do cromossomo e/ou elementos genéticos móveis, sendo responsáveis pela codificação de produtos e propriedades que podem determinar a patogenicidade e, consequentemente, a virulência de bactérias³⁹.

As bactérias causam doença por uma variedade de mecanismos de virulência em complexo processo de invasão das barreiras protetivas do hospedeiro, evasão dos mecanismos do sistema de defesa deste, além de multiplicação e perpetuação de novas bactérias, causando dano ao hospedeiro³. Evidências científicas indicam que a própria resposta inflamatória do hospedeiro suscetível atua como um gatilho e consequentemente age diretamente na taxa de colonização microbiana no intestino. Quando há proliferação de bactérias patogênicas no intestino, a possibilidade de aquisição de genes de virulência e resistência por transferência horizontal pode ser potencializada¹⁸.

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descrita em 1885 pelo pediatra Theodor Escherich, nas fezes de uma criança com diarreia. Em 1893, já se postulava que a bactéria na verdade possuía diferentes cepas, algumas patogênicas e outras não. Atualmente, as espécies de *E. coli* são subdividas em várias cepas patogênicas que causam diferentes enfermidades em seres humanos e animais⁴⁰.

A bactéria *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, e está normalmente presente no intestino de mamíferos e aves. Ainda que considerada uma bactéria comensal, muitas vezes é qualificada como um dos agentes bacterianos mais frequentes em diarreias de seres humanos e animais⁴¹.

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos⁴². As análises filogenéticas têm mostrado que cepas desta bactéria podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie, sendo: A, B1, B2 e D⁴³. As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Por outro lado, normalmente as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1^{44,45,46,47,48}.

E. coli pode ser classificada conforme seu patotipo em: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), extra intestinal (EXPEC), entero-hemorrágica (EHEC), produtora de toxina Shiga (STEC), uropatogênica (UPEC), e outras como enteropatogênica para suínos (PEPEC); enteropatogênica para coelhos (REDEC) e patogênica para aves (APEC)³.

Dentre estas bactérias, as que produzem a toxina Shiga (STEC) são um dos patotipos mais importantes para saúde pública (verotoxinogênica), tendo o sorotipo O157:H7⁴⁹ como exemplo de patógeno de alta periculosidade para seres humanos causando enfermidades em milhares de pessoas todos os anos. Sua presença é atribuída à alimentos contaminados, principalmente produtos cárneos, sendo que esta bactéria, além de produzir toxinas é capaz de colonizar o epitélio intestinal e provocar lesões diretas à mucosa^{49, 50}. Sinais típicos da doença por este sorotipo incluem diarreia, com sangue, dores estomacais e vômitos, com possível progressão para síndrome urêmica e óbito⁵¹.

A importância de determinar a patogenicidade e fatores de virulência dos isolados de *E. coli* não se limita a sorotipos já conhecidos e típicos causadores de surtos em seres humanos e animais. A ocorrência do sorotipo O104: H4 em países como Alemanha, Coréia do

Sul e França colocou em evidência a possibilidade do surgimento de novos patógenos apresentando características virulentas combinadas de *E. coli* EHEC e EAEC, além de resistência a antimicrobianos⁵².

E. coli é um contaminante comum (coliforme fecal) em água e alimentos, considerada um indicador para predizer a qualidade da água de consumo e uso comum^{53, 54}. Uma vez eliminada no meio ambiente, a bactéria pode sobreviver por até 11 semanas quando em condições ideais de temperatura e umidade, sendo portanto passível de infectar animais suscetíveis pela contaminação ambiental⁵⁵.

Em estudo realizado por Heiman et al.⁵¹ foram avaliados centenas de surtos de doença provocada por *E. coli* determinando a origem da infecção. Observou-se que alimentos de origem animal contaminados eram a principal fonte de *E. coli*, entretanto o contato com animais de produção e seu ambiente, bem como vegetais e frutas contaminados com a bactéria também foram categóricos na ocorrência de metade dos surtos.

As manifestações de doenças por *E.coli* são associadas a diversos fatores, destacando os genes de virulência codificados por plasmídeos, bacteriófagos, ou ilhas de patogenicidade (IP). Acredita-se que a maior parte dos sorogrupos de *E.coli* não apresentem qualquer gene de virulência, porém, durante o processo evolutivo, algumas cepas adquirem diferentes combinações de genes que lhe atribuem capacidade de promover enfermidades³.

Muitos estudos descrevem que cepas de *E.coli* comensais podem conter um ou mais genes de virulência, apresentando portanto, potencial de causar doenças em animais imunosuprimidos e/ou saudáveis^{42,56,57,58}. Aderência é o primeiro e principal componente que atua na colonização intestinal. *E. coli* expressa fímbrias e adesinas não-fímbriais que medeiam a adesão às células epiteliais intestinais, sendo estas características favoráveis tanto na sua atuação como componente normal da microbiota intestinal (e inclusive podendo atuar como probiótico e competir com microrganismos patogênicos), quanto na sua atuação como patógeno⁵⁹.

Adicionalmente, alguns genes de virulência como: *pap* (pili associado à pielonefrite), *crl* (curli), *eae* (intimina), *iuc* (aerobactina) e *iss* (resistência sérica) são determinantes para a patogenia da doença, como demonstrados em estudos desses genes em cepas de *Escherichia coli* isolados de animais com sinais clínicos de colibacilose^{60,61}. Sabe-se que existem mais de 30 genes de virulência descritos em cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas, estando estes presentes em elementos móveis e de fácil transferência entre bactérias⁴⁰.

O estudo da resistência a antimicrobianos em *E. coli* comensais e patogênicas atua como excelente indicador de seleção antimicrobiana no ambiente. Evidências recentes detectam genes de resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis para uso em animais⁶². De forma curiosa observa-se também múltiplos relatos de *E. coli* resistentes a antimicrobianos que há muito tempo foram proibidos no âmbito da produção animal, caracterizando possível contaminação ambiental e alimentar. A presença de *E. coli* multirresistentes se entende sem controle, tornando-se necessário a implementação de medidas de vigilância que se apliquem a saúde pública e ambiental com intuito de limitar a disseminação deste possível patógeno⁶³.

2.2.2 *Salmonella* sp.

A bactéria *Salmonella* passou por processo evolutivo como patógeno há mais de 100 milhões de anos, tendo os bacteriófagos e a aquisição de “ilhas de patogenicidade” como essência nesta evolução. As transformações permitiram que esta bactéria se tornasse patogênica e causasse doença em animais, e vários estudos demonstram a presença de plasmídeos e ilhas de patogenicidade que também tornaram possível sua atividade como agente infeccioso⁶⁴. Estima-se que um quarto do genoma de salmonelas patogênicas tenha sido adquirido por transferência horizontal³⁶.

O gênero *Salmonella* foi nomeado em função de seu descobridor Daniel E. Salmon (1850–1914)⁶⁵. São formadas principalmente por espécies que apresentam motilidade, com poucas variantes imóveis. Resistem à dessecação e ao congelamento, podendo sobreviver no ambiente em períodos que variam de meses a anos. Animais de sangue frio e quente atuam como reservatórios de diversas espécies de *Salmonella* em seu trato gastrointestinal, podendo contaminar solo, vegetação, água e alimentos⁶⁶.

A classificação em sorotipos de *Salmonella* está baseada atualmente no esquema de White-Kaufmann-Le Minor e envolve mais de 2600 sorotipos de *Salmonella* identificados. Está relacionada à caracterização de seus antígenos somáticos (O) de parede natureza lipopolissacarídea, os flagelares (H) de natureza proteica e os capsulares ligados à virulência (Vi). As subespécies de *Salmonella* são divididas em sorogrupos, cuja classificação é feita à partir do antígeno O. Dentro dos sorogrupos existem os sorotipos específicos. Ainda, cada subespécie possui vários sorotipos e suas respectivas cepas, onde aproximadamente 99 % dos sorotipos mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica*⁶⁷.

Baseado em estudos genômicos o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*⁶⁷. *Salmonella enterica* possui seis subespécies expressas por nomes e algarismos romanos, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II); *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtanae* (IV), e *S. enterica* subespécie *indica* (VI)⁶⁸. A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, possui uma grande variedade de sorotipos, que são designados após a subespécie ou após o gênero, escritos com a letra inicial maiúscula: Agona, Cholerasuis, Infantis⁶⁹.

O principal mecanismo de transmissão da bactéria a animais suscetíveis é a rota oro-fecal, pela ingestão de alimentos ou água contaminados e sendo muito comum problemas relacionados à contaminação ambiental, com possibilidade de formação de biofilme e manutenção da bactéria no ambiente por longos períodos⁷⁰. A multiplicação da bactéria acontece primariamente nas células do sistema monocítico-macrofágico e à partir deste pode tomar forma de doença sistêmica em animais e seres humanos suscetíveis⁷¹. A sua evidente importância como patógeno em saúde pública suscitou a necessidade de legislação e medidas específicas, onde há inviabilização do consumo e comercialização de produtos em que haja o isolamento de *Salmonella*⁷².

A base da adaptação ao hospedeiro em certos sorotipos de *Salmonella* permanece pouco elucidada, porém, acredita-se que esteja relacionada à plasticidade de seu genoma e à transferência de genes mediada por fagos ou de forma horizontal^{73,74,75}. Vários destes sorotipos podem também, após o aparecimento e posterior resolução da doença clínica no animal, persistir nos tecidos deste durante longos períodos, ou ainda, podem infectar o animal sem manifestação clínica caracterizando focos de contaminação assintomáticos em animais de produção^{71,76,77}, havendo grande implicação de aves⁷⁸, suínos^{77,79,80} e bovinos como reservatórios da bactéria⁸¹.

As infecções causadas por salmonelas são transmitidas frequentemente por alimentos de origem animal, mas frutas e vegetais contaminados também são importantes na cadeia epidemiológica da salmonelose. Muitos sorotipos específicos como *Salmonella* Heidelberg e Enteritidis são isolados em surtos da doença causados pela ingestão de ovos e outros produtos de origem animal. Em surtos que ocorrem pela ingestão de vegetais contaminados, sorotipos como Litchfield e Poona são isolados e provém de pequenos animais reservatórios, como répteis e anfíbios. Já os sorotipos Typhimurium e Newport ocorrem em surtos associados tanto à ingestão de alimentos de origem animal quanto alimentos de origem

vegetal contaminados com a bactéria. A diferenciação nestes casos pode ser feita a partir da diferença entre o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, que tende a apresentar pouca ou nenhuma sensibilidade em salmonelas provenientes de animais de produção, ocorrendo o inverso em salmonelas provenientes de outras contaminações onde há a presença de bactérias com pouca ou nenhuma resistência a antimicrobianos⁷⁸.

Todos os anos mais de 200.000 relatos de salmonelose em seres humanos causadas por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg ocorrem apenas nos E.U.A., sendo estes dois sorotipos de importância elementar em saúde pública neste país e em nível mundial. Ambos sorotipos são focos de estudo em muitas localidades e a preocupante multirresistência e evidente presença de fatores de virulência atenta as autoridades de saúde quanto ao surgimento de patógenos de difícil controle⁸². Recentemente a ocorrência de casos de salmonelose em humanos em vários países da Europa causada por *Salmonella* Enteritidis⁸³, bem como a ocorrência de distintos surtos desde o início da década de 2010, atentam para a importância de determinar a origem dos surtos a fim de esclarecer e eliminar os possíveis focos da bactéria⁸⁴⁻⁸⁶.

A análise genotípica de *Salmonella* tem se revelado uma ferramenta útil para tipagem epidemiológica de diferentes sorotipos da bactéria. A utilização da Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) apresenta maior sensibilidade e maior rapidez no diagnóstico, representando uma ferramenta importante na identificação e caracterização de genes de virulência e resistência encontrados em diferentes espécies de *Salmonella*⁶⁴.

A diversidade do genoma de *Salmonella enterica* esta relacionado à aquisição de elementos genéticos móveis que conferem vantagem como patógeno, tanto por resistir a várias classes de antimicrobianos quanto por deter expressão de características virulentas. Muitos estudos caracterizam a presença de genes de virulência como *spvC* (*Salmonella* plasmid virulence), importante na multiplicação bacteriana no sistema retículo-endotelial de vertebrados e presente em todos sorotipos de *Salmonella*⁸⁷. Além de vários genes de resistência como *intl* (integrons de classe 1)⁸⁸, *blaTEM* (resistência à cefalosporina)⁸⁹, *sulI* (resistência a sulfonamida)⁸⁸ e *qnr* (resistência a quinolonas)⁹⁰.

2.3 Considerações sobre resistência antimicrobiana

A introdução de antimicrobianos na década de 40 proporcionou um declínio na mortalidade por doenças infecciosas e consagra-se tal feito como um marco importante na história da medicina. A partir de então os antimicrobianos se tornaram de uso extensivo para

prevenção e tratamento, bem como promotor de crescimento animal⁹¹.

Sabe-se que o sucesso de um quimioterápico contra um determinado microrganismo é possível devido a chamada toxicidade seletiva, em que um agente antimicrobiano deve ser mais tóxico ao patógeno do que ao hospedeiro. No caso das bactérias, tal característica é possível graças as diferenças estruturais e bioquímicas existentes entre elas e a célula eucariótica do hospedeiro³⁵. Dentre as principais diferenças, pode-se destacar nas células bacterianas a existência de único cromossomo disperso no citoplasma que não está circundado por membrana nuclear, presença de ribossomo do tipo 70S, além de parede celular contendo peptidoglicano que confere forma e proteção à célula⁹².

A atividade de agentes antimicrobianos é influenciada pelo sítio de ação, taxa de absorção e poder de penetração na célula e pelo metabolismo do agente específico. Por isso, a atividade de determinado agente antimicrobiano pode ser totalmente afetada pela interação entre patógeno e fármaco, bem como entre o hospedeiro e o patógeno³³. A resistência intrínseca a antimicrobianos existe em várias ocasiões com a produção de enzimas, baixa permeabilidade do agente antimicrobiano a membrana bacteriana ou presença de proteínas transportadoras que promovem o efluxo destes agentes antimicrobianos, ou ainda, a combinação destas situações. As bactérias também podem adquirir resistência por meio da aquisição de genes específicos que codificam mecanismos de resistência similares a aqueles presentes intrinsecamente em bactérias resistentes. Estes genes que codificam resistência a antimicrobianos são frequentemente carregados em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons⁹³.

Ao analisar o fenômeno de resistência aos antimicrobianos, observa-se que o mesmo tem origem genética e está relacionado a presença de genes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos capazes de impedir a multiplicação ou eliminar os microrganismos³. Para o microrganismo desenvolver resistência ao agente antimicrobiano deve-se haver mutações espontâneas, que caracteriza a via cromossomal, ou transferência de material genético de uma bactéria para outra por via horizontal⁸⁹.

Múltiplos genes de resistência são encontrados em regiões cromossômicas ou em elementos móveis como observado em plasmídeos principalmente⁶³. A presença de genes com *bla*TEM, que produz enzimas β lactamases inibidoras de antimicrobianos β -lactâmicos, são frequentemente encontrados em plasmídeos de bactérias ambientais e entéricas^{88,89}. Genes de resistência a quinolonas podem ser encontrados no cromossomo, plasmídeos e, recentemente, muitas partículas de bacteriófagos também estão sendo encontradas, fato este que facilita sua transmissão às outras bactérias presentes no mesmo ambiente⁹⁴.

O fato dos fármacos antimicrobianos serem parcialmente metabolizados no organismo de humanos e animais, faz com que grande quantidade seja liberada no ambiente, caracterizando importante fator para evolução e seleção de resistência antimicrobiana para bactérias patogênicas⁹¹. Com concentrações variáveis de antimicrobianos e seus respectivos metabólitos no ambiente, há maior contato dos microrganismos com tais substâncias e aumenta-se a pressão de seleção das bactérias resistentes e há aumento da prevalência de patógenos multirresistentes, caracterizando uma evidente ameaça à saúde pública⁹⁵.

A resistência aos antimicrobianos está aumentando em todo o mundo e microrganismos patogênicos multirresistentes são relatados com frequência⁹³. Múltiplos genes codificando resistência antimicrobiana são frequentemente encontrados em reservatórios de água tratada, rede de esgoto, oceano^{54,95-97} e em ambientes tipicamente contaminados como hospitais e em produtos de origem animal, bem como local de produção de animais^{5,90,98}.

Alerta-se ainda, que a resistência de uma bactéria a determinado antimicrobiano pode também gerar também resistência cruzada a fármacos da mesma classe, como observado com o grupo dos bacteriostáticos, que incluem as sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos. Bactérias não patogênicas ou comensais podem adquirir resistência aos antimicrobianos que habitualmente seriam eficazes frente a estes organismos e uma possível transferência horizontal a bactérias patogênicas³³.

Com base no exposto e na escassez de trabalhos científicos sobre os temas supracitados, o presente estudo visa investigar a ocorrência de *E. coli* e *Salmonella* sp. em amostras de javalis (*S. scrofa*), catetos (*P. tajacu*) e queixadas (*T. pecari*) oriundos de criatórios comerciais localizados no Estado de Goiás.

Referências

1. Ruiz - Fons F. A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: changes modulating the risk of transmission to humans. *Transboundary and emerging diseases*. 2015.
2. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual review of food science and technology*. 2016;7:287-312.
3. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. ed. editor^editors.: John Wiley & Sons; 2011. p.
4. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10ª edição. Artmed editora SA Porto Alegre RS. 2012:226-239.
5. Fischer J, Rodríguez I, Baumann B, Guiral E, Beutin L, Schroeter A, Kaesbohrer A, Pfeifer Y, Helmuth R, Guerra B. blaCTX-M-15-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(11):2951-2958.

6. Quesada A, Porrero MC, Téllez S, Palomo G, García M, Domínguez L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;dku320.
7. Walfrido Kühl Svoboda EBJ. O papel e a importância do Médico Veterinário na Saúde Pública. Conselho Regional de Medicina veterinária - PR. 2011.
8. Randi E, Lucchini V, Diong CH. Evolutionary genetics of the Suiformes as reconstructed using mtDNA sequencing. *Journal of Mammalian Evolution*. 1996;3(2):163-194.
9. Oliveira-Monteiro N, Lopes-Rodrigues V, Bastos E, Guedes-Pinto H. Suiformes conservation: a study case of strategies for DNA utilization. *Journal of genetics*. 2013;92(2):e49.
10. Groves CP, Grubb P. The suborder suiformes. Pigs, peccaries, and hippos: status survey and conservation action plan. 1993:1-4.
11. Chen K, Baxter T, Muir WM, Groenen MA, Schook LB. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). 2007.
12. Ferreira AH. Produção de Suínos: Teoria e Prática. Brasília: Associação.
13. Silva VS, Mourao GdM, Kramer B, Campos Z, Piovezan U. Javalis, Javaporcos e Suiformes nativos. Saiba diferenciar e conserve a fauna nativa. Embrapa Pantanal-Folhetos/Folhetos/Cartilhas (INFOTECA-E). 2014.
14. Deberdt AJ, Scherer SB. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Natureza & Conservação*. 2007;5(2):23-30.
15. de Oliveira CHS. Ecologia e manejo de javali (*Sus scrofa* L.) na América do Sul. 2012.
16. Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2009;364(1530):2697-2707.
17. Sannö A, Aspán A, Hestvik G, Jacobson M. Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157: H7 in wild boars. *Epidemiology and infection*. 2014;142(12):2542-2547.
18. Schierack P, Rödiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PloS one*. 2013;8(4):e59242.
19. Quintela FM, Santos MB, de Oliveira SV, Costa RC, Christoff AU. Javalis e porcos ferais (*Suidae*, *Sus scrofa*) na Restinga de Rio Grande, RS, Brasil: ecossistemas de ocorrência e dados preliminares sobre impactos ambientais. *Neotropical Biology & Conservation*. 2010;5(3).
20. Doliveira PS, Ribeiro ACdCL, Suzuki LS. Animais silvestres: quando se tornam problema. Embrapa Gado de Leite-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). 2014.
21. Groves C, Grubb P. *Ungulate taxonomy*. ed. editor^editors.: JHU Press; 2011. p.
22. Furtado MM, Kashivakura CK, Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Artiodactyla-Tayassuidae e Suidae (cateto, queixada, javali). *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. Editora Roca, São Paulo. 2007:615-629.
23. Keuroghlian A, Desbiez ALJ, de Mello Beisiegel B, Medici EP, Gatti A, Pontes ARM, de Campos CB, de Tófoli CF, Júnior EAM, de Azevedo FC. Avaliação do risco de extinção do queixada *Tayassu pecari* Link, 1795, no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. 2012(1):84-102.
24. Herrera HM, Abreu UGP, Keuroghlian A, Freitas TP, Jansen AM. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitology research*. 2008;103(3):619-624.
25. Brasil L. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Publicada no Diário Oficial da União. 1998.
26. Hofmann GS. Taiassuídeos simpátricos no norte do pantanal brasileiro: implicações da estacionalidade climática, do uso da terra e da presença de uma espécie invasora nas interações competitivas entre caititis (*Pecari tajacu*) e queixadas (*tayassu pecari*). 2013.
27. Shender LA, Glock RD, Spraker TR. Salmonellosis in a free-ranging population of javelinas (*Pecari tajacu*) in south central Arizona. *Journal of wildlife diseases*. 2009;45(4):941-951.
28. Vieira RFdC, Molento MB, Guimarães AMS, Santos APd, Bonat M, Javorouski ML, Popp L, Santos LCd, Moraes W, Cubas ZS. Use of a *Mycoplasma suis*-PCR protocol for screening a population of captive peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2011;20(1):75-77.

29. Coutinho TA, Moreno AM, Imada Y, Lopez RPG, Neto JSF. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from Brazilian *Tayassu pecari*. *Tropical animal health and production*. 2012;44(4):689-692.
30. de Castro AMMG, Brombila T, Bersano JG, Soares HS, Silva SOdS, Minervino AHH, Ogata RA, Gennari SM, Richtzenhain LJ. Swine infectious agents in *Tayassu pecari* and *Pecari tajacu* tissue samples from Brazil. *Journal of wildlife diseases*. 2014;50(2):205-209.
31. Snak A, Garcia FG, da Silveira Delgado LE, Osaki SC. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in wild animals living in the Cascavel city park, Paraná, Brazil. *Ocorrência de Cryptosporidium spp. em animais silvestres do Parque municipal de Cascavel, Paraná, Brasil*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 2015;36(6 suplemento 2):4323-4332.
32. Solorio MR, Gennari SM, Soares HS, Dubey JP, Hartley ACZ, Ferreira F. *Toxoplasma gondii* antibodies in wild white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) from Peru. *Journal of Parasitology*. 2010;96(6):1232-1232.
33. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. ed. editor^editors.: Artmed Editora; 2005. p.
34. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(3):463-469.
35. Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Cosby CD. *Microbiology: With diseases by body system*. ed. editor^editors.: Benjamin Cummings; 2012. p.
36. Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection*. 2003;5(11):977-989.
37. Wray C, Wray A. *Salmonella in domestic animals*. ed. editor^editors.: Cabi; 2000. p.
38. Langridge GC, Phan M-D, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, Charles I, Maskell DJ, Peters SE, Dougan G. Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome research*. 2009;19(12):2308-2316.
39. de Oliveira AP, Sola MC, Feistel JC, Moreira NM, de Oliveira JJ. *Salmonella enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade*. 2013.
40. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013;152(1):2-12.
41. Ferreira AJP, Knöbl T. *Colibacilose aviária. Doença das aves*. Facta, Campinas. 2000.
42. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamale P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of bacteriology*. 2007;189(8):3228-3236.
43. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4555-4558.
44. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1990;172(11):6175-6181.
45. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Molecular biology and evolution*. 1998;15(12):1685-1695.
46. Sabaté M, Moreno E, Perez T, Andreu A, Prats G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical microbiology and infection*. 2006;12(9):880-886.
47. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+ D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(5):669-675.
48. Mora A, López C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Herrera A, Mamani R, Bonacorsi S, Moulin-Schouleur M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1: K1: H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC microbiology*. 2009;9(1):1.
49. Cornick NA, Helgersson AF. Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157: H7 in swine. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(9):5331-5335.
50. Cadona JS, Bustamante AV, Parma AE, Lucchesi PMA, Sanso AM. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin - producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. *Letters in applied microbiology*. 2013;56(6):449-455.

51. Heiman KE, Mody RK, Johnson SD, Griffin PM, Gould LH. *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(8):1293.
52. Karch H, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, Ron EZ, Tønnum T, Sansonetti PJ, Vicente M. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104: H4 outbreak. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(9):841-848.
53. Gilpin BJ, Gregor JE, Savill MG. Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers. *Water science and technology*. 2002;46(3):9-15.
54. Ahmed W, Tucker J, Bettelheim KA, Neller R, Katouli M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water research*. 2007;41(16):3785-3791.
55. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary research*. 1999;30(2):299-316.
56. Kariyawasam S, Johnson TJ, DebRoy C, Nolan LK. Occurrence of pathogenicity island IAPEC-O1 genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian diseases*. 2006;50(3):405-410.
57. Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard DJ, Barthel M, Westendorf AM, Krogfelt KA, Walker AW. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(4):1269-1274.
58. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2011;62(1):1-10.
59. Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D, Zinke O, Ansorge H. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(19):5814-5829.
60. Schierack P, Walk N, Ewers C, Wilking H, Steinrück H, Filter M, Wieler LH. ExPEC - typical virulence - associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environmental microbiology*. 2008;10(7):1742-1751.
61. Schierack P, Weinreich J, Ewers C, Tachu B, Nicholson B, Barth S. Hemolytic porcine intestinal *Escherichia coli* without virulence-associated genes typical of intestinal pathogenic *E. coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(23):8451-8455.
62. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Beef Cattle. *Applied and environmental microbiology*. 2015:AEM-01511.
63. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Sebra R, Lynch T, Anson L, Kasarskis A, Motyl MR, Crook DW, Pitout JD. First report of blaIMP-14 on a plasmid harboring multiple drug resistance genes in *Escherichia coli* ST131. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016:AAC-00840.
64. Bäumlér AJ, Hargis BM, Tsoilis RM. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science*. 2000;287(5450):50-52.
65. Bush EJ, Wagner B, Fedorka-Cray PJ. Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by US finishing hogs. 1999.
66. Hirsh DC, Zee YC, de Souza Coutinho A. *Microbiologia veterinária*. ed. editor^editors.: Guanabara Koogan; 2003. p.
67. Grimont PAD, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. 2007;9.
68. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PAD, Weill F-X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Research in microbiology*. 2010;161(1):26-29.
69. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adenubi OT. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia microbiologica*. 2011;56(6):497-503.
70. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*. 2006;152(11):3411-3424.

71. Meyerholz DK, Stabel TJ, Ackermann MR, Carlson SA, Jones BD, Pohlenz J. Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Veterinary Pathology Online*. 2002;39(6):712-720.
72. Spricigo DA, Matsumoto SR, Espíndola ML, Ferraz SM. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;28(4):779-785.
73. Brunder W, Karch H. Genome plasticity in Enterobacteriaceae. *International journal of medical microbiology*. 2000;290(2):153-165.
74. Liu G-R, Liu W-Q, Johnston RN, Sanderson KE, Li S-X, Liu S-L. Genome plasticity and ori-ter rebalancing in *Salmonella typhi*. *Molecular Biology and Evolution*. 2006;23(2):365-371.
75. Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(2):162-168.
76. Alban L, Stärk KDC. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Preventive veterinary medicine*. 2005;68(1):63-79.
77. Swanenburg M, Urlings HAP, Snijders JMA, Keuzenkamp DA, Van Knapen F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;70(3):243-254.
78. Jackson BR, Griffin PM, Cole D, Walsh KA, Chai SJ. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(8):1239-1244.
79. Silva MCdSG, de Paulali FDAJ, Caramori RPMJG, KichIv JJD. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Orion*. 2009;1:2.
80. Mueller-Doblies D, Speed K, Davies RH. A retrospective analysis of *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010. *Preventive veterinary medicine*. 2013;110(3):447-455.
81. Almeida ASd, Gonçalves PMR, Franco RM. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. *Hig. aliment*. 2002;16(96):77-81.
82. Han J, Lynne AM, David DE, Tang H, Xu J, Nayak R, Kaldhone P, Logue CM, Foley SL. DNA sequence analysis of plasmids from multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates. *PloS one*. 2012;7(12):e51160.
83. UFSA. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8, MLVA type 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections. EFSA Supporting Publications. 2016.
84. Kinross P, Van Alphen L, Urtaza JM, Struelens M, Takkinen J, Coulombier D, Mäkelä P, Bertrand S, Mattheus W, Schmid D. Multidisciplinary investigation of a multicountry outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with turkey meat in the European Union, August 2011 to January 2013. 2014.
85. De Knecht LV, Pires SM, Hald T. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiology and infection*. 2015;143(06):1175-1186.
86. Snary EL, Swart AN, Simons RRL, Domingues ARC, Vigre H, Evers EG, Hald T, Hill AA. A Quantitative Microbiological Risk Assessment for *Salmonella* in Pigs for the European Union. *Risk Analysis*. 2016;36(3):437-449.
87. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *International Microbiology*. 2010;2(3):177-184.
88. Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC microbiology*. 2011;11(1):1.
89. Shahada F, Sugiyama H, Chuma T, Sueyoshi M, Okamoto K. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of β -lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Veterinary microbiology*. 2010;140(1):136-141.
90. Dheilly A, Le Devendec L, Mourand G, Boudier A, Jouy E, Kempf I. Resistance gene transfer during treatments for experimental avian colibacillosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):189-196.
91. Laxminarayan R. Battling resistance to antibiotics and pesticides: An economic approach. ed. editor^editors.: Routledge; 2010. p.

92. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2009;27(1):44-52.
93. Schultz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*. *Drugs*. 2012;72(1):1-16.
94. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014:dkf528.
95. Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*. 2012;421:173-183.
96. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301(8):654-658.
97. Centres for Disease C, Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. ed. editor^editors.: Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2013. p.
98. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(17):1242-1249.

CAPÍTULO 2- *Escherichia coli* E *Salmonella* sp. EM *Tayassu pecari* E *Pecari tajacu*, SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E GENES DE VIRULÊNCIA

RESUMO

As bactérias *Salmonella* sp. e *E.coli* estão implicadas em infecções em humanos e animais, quando, muitas vezes requerem a utilização de terapia antimicrobiana para seu tratamento. Objetivou-se com este estudo foi o isolamento, a análise de perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção de genes de virulência em *E. coli* provenientes de *Pecari tajacu* e *Tayassu pecari* de criatórios comerciais no Estado de Goiás. Dentre uma amostragem de 90 animais, obteve-se 31 isolados de *E. coli*, sendo que em 16 isolados oriundos de *P. tajacu* houve multirresistência aos antimicrobianos testados e seis isolados de *T. Pecari* em situação similar. Detectou-se o gene de resistência sérica *iss* em quatro isolados, e os genes de virulência *papC* em cinco, *tsh* e *eae* em um isolado cada. Houve a associação potencialmente patogênica entre os genes *papC* e *eae*, e entre *tsh* e *iss*. Em um isolado de *E. coli* de *P. tajacu* houve a formação de beta hemólise. Não houve isolamento de *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras. Conclui-se que *T. pecari* e *P. tajacu* são potenciais reservatórios de *E. coli* patogênicas e multirresistentes aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Enterobactérias, fatores de virulência, multirresistência, Taiassuídeos.

Escherichia coli AND *Salmonella* sp. IN *Pecari tajacu* AND *Tayassu pecari*, ANTIMICROBIAL PROFILE AND VIRULENCE GENES DETECTION

ABSTRACT

Salmonella sp. and *Escherichia coli* bacteria are implicated in human and animal infections, when it can require the antimicrobial treatment in many situations. The main object of this study was to isolate and analyze the antimicrobial profile, as also to also detect virulence genes of commensal *E. coli*, from *Pecari tajacu* and *Tayassu Pecari* from commercial herds in Goiás State. Among a sampling of 90 healthy animals, a total of 31 *E. coli* were isolated, where 16 isolated from *P. Tajacu* presented multidrug resistance and six in *T. Pecari* showed similar pattern. The virulence genes detected was *papC*, in five isolates, *tsh* in one and *eae* in one isolate each. The serum resistance gene *iss* were detected in four different isolates. It was also observed association between genes, and presence of hemolysin in one isolate. No *Salmonella* sp. isolation were obtained in the samples. It is conclude that *T. pecari* and *P. tajacu* are potential reservoir of pathogenic and multidrug resistant *E. coli*.

Key-words: Enterobacteriaceae, multidrug resistant bacteria, virulence factors, Tayassuids.

Introdução

Os membros da família *Tayassuidae*: *Tayassu pecari* (queixada) e *Pecari tajacu* (cateto) possuem grande distribuição geográfica na América do Sul, sendo encontrados em todos os biomas do Brasil. Estes animais possuem hábito ambulante, podendo ter contato com diversos animais e regiões em curto espaço de tempo, e atuar como reservatórios e disseminadores de vários microrganismos^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}, sendo desconhecido ainda o potencial dos mesmos para albergar bactérias enteropatogênicas.

Escherichia coli é uma bactéria habitante comum do trato intestinal de grande variedade de animais e seres humanos, sendo de fácil disseminação em diferentes ecossistemas por meio da água, solo, alimentos e vários possíveis fômites^{8,9}. Ocasionalmente, *E. coli* é implicada em infecções em humanos e animais, quando, inclusive, requer a utilização de terapia antimicrobiana. Em diversos casos, a terapia com antibióticos apresenta falhas, devido à resistência a vários princípios ativos de uso rotineiro em medicina humana e veterinária¹⁰. Observa-se que o material fecal de diversos animais contém grande quantidade de linhagens de *E. coli* que apresentam genes de virulência^{11,12}, e considerada um contaminante presente em diferentes ecossistema, sendo também importante em estudos que visam traçar a evolução da resistência aos antimicrobianos¹³.

O gênero *Salmonella* é composto por bactérias muito importantes na área de medicina veterinária e saúde pública, pois é responsável por doença em animais e humanos, e extensas perdas econômicas na produção animal. Também é extensivamente estudada em termos de fisiologia, genética e estrutura celular, sendo uma das bactérias patogênicas melhor caracterizadas em termos de virulência. A virulência da *Salmonella*, e seus respectivos sorotipos, é multifatorial e complexa, incluindo presença de estruturas como fimbrias e flagelos, bem como sua habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais¹⁴.

Em várias espécies de bactérias entéricas observa-se que os genes codificadores de funções específicas são altamente propensos à recombinação e transferência gênica horizontal de modo que antígenos similares podem ser encontrados em cepas distantemente relacionadas. Características de virulência, encontradas expressadas por genes presentes em elementos genéticos transferíveis como plasmídeos e transposons, têm a possibilidade de reestruturação de inúmeras cepas e pode acontecer de forma natural no ambiente em que se encontram¹⁵. Os genes de virulência codificam características que auxiliam na capacidade patogênica de cada bactéria como a adesão, aquisição de ferro, formação de biofilme e resistência no soro¹⁶. Os genes *iss* (*increased serum survival*), *tsh* (*temperature sensitive*

hemaglutinine), *papC* (*pilus associates with pyelonephritis*) e *eae* (*enteric attaching and effacing*), entre outros genes de virulência, são encontrados em isolados patogênicos¹⁷.

Bactérias com resistência aos antimicrobianos e com fatores de virulência representam um problema em saúde pública e animal, havendo indícios de contaminação ambiental e de alimentos como possíveis origens de surtos de infecções¹⁸.

A necessidade de estudar animais silvestres como reservatório de agentes etiológicos causadores de doenças se torna fundamental e neste contexto situam-se os taiassuídeos. No Brasil, são escassos os estudos que qualificam as enterobactérias em animais silvestres em cativeiro, principalmente na família *Tayassuidae*. Objetivou-se pelo presente estudo o isolamento e a análise de perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência em *E. coli* e *Salmonella* sp., em amostras fecais provenientes de catetos e queixadas de criatórios comerciais no Estado de Goiás.

Material e Métodos

Local: As análises bacteriológicas foram conduzidas e realizadas nos Laboratórios de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

Amostras: As coletas foram realizadas em três criatórios comerciais de animais silvestres (um criatório de *P. tajacu* e dois criatórios de *T. pecari*) habilitados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) para criação e venda de taiassuídeos no Estado de Goiás. Toda a conduta experimental com os animais *in vivo* foi realizada com Autorização para atividade científicas fornecida pelo IBAMA (Anexo A) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA-UFG)(Anexo B).

Com auxílio de técnicas de contenção física dos animais, procedeu-se a coleta de suabes retais que foram alocados em tubos contendo 10 mL de água peptonada a 1%, e mantidos sob refrigeração até o momento da realização de técnicas de processamento bacteriológico¹⁹. Os suabes retais foram realizados de forma aleatória abrangendo animais hígidos, machos e fêmeas de diferentes faixas etárias.

Foram coletados 90 suabes retais no total, sendo 30 amostras em cada propriedade, *P. tajacu* (cateto)(n= 30) e 60 amostras de *T. pecari* (queixada)(n= 60).

Pesquisa de *E. Coli* e teste de hemólise: As amostras de suabe retal em água peptonada a 1% foram incubadas a 37° C por 18-24 horas, sendo posteriormente fracionadas em

aproximadamente 1mL, inoculadas em caldo de *Brain heart infusion* (BHI) e incubadas à 37° C/ 18-24Hs, e posteriormente plaqueadas em ágar MacConkey²⁰.

Foram selecionadas três a cinco Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e repicadas em tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), incubadas a 37°C, durante 24 horas. A identificação de *Escherichia coli* por testes bioquímicos fenotípicos, caracterizou-se por testes de motilidade, produção de indol, hidrólise de urease, H₂S, malonato, reação vermelho metila e reação no citrato de Simmons. Além desses testes, os isolados foram submetidos ao teste de hemólise, realizado em ágar BHI contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após semeadas, as placas foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs para avaliação de presença ou ausência de hemólise²⁰.

Isolamento e identificação de *Salmonella*: As amostras de suabe retal em água peptonada a 1% foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs, sendo posteriormente transferidos 1 mL dessa solução para 9 mL de caldo Selenito Cistina e 1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis, incubados à 37° C/ 18-24Hs. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas dos caldos supracitados foram plaqueadas por esgotamento em estrias, em duplicata para meios seletivos: Ágar Verde Brilhante e Hektoen, novamente incubado à 37° C/ 18-24Hs. Onde três a cinco UFC com características morfológicas de *Salmonella* foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), incubados à 37° C/ 18-24Hs. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos aos seguintes testes: teste uréase, produção indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste de malonato e citrato de Simmons¹⁹.

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos: O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco-difusão usando o meio de Muller-Hinton²¹.

Para *E. coli* e *Salmonella* foram utilizados os seguintes antimicrobianos: doxiciclina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), tetraciclina (30mcg), neomicina (30mcg), ceftriaxona (30mcg), ampicilina (10mcg), amoxicilina(3mcg), sulfonamida (300mcg), sulfazotrim (25mcg).

As placas contendo ágar Muller-Hinton e semeadas com a suspensão bacteriana e com discos de antimicrobianos foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs. A leitura e interpretação dos diâmetros dos halos foram efetuadas segundo as diretrizes de CLSI ²¹.

Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRA): O IRA foi calculado pela razão entre o número de classes de antimicrobianos contra as quais cada isolado é resistente e o número total de classes testadas (7 classes). Índices >0,2 foram considerados como multirresistentes²².

Os perfis de multirresistência dos isolados diante dos diferentes antimicrobianos foram também avaliados. Os isolados que apresentaram resistência, simultânea, a três ou mais antimicrobianos de diferentes grupamentos eram considerados multirresistentes²³.

Extração de DNA de *Escherichia coli*: Após inoculação de *E. coli* em 4 mL de BHI e incubação à 37° C/ 18-24Hs, 1 mL foi transferido para tubo de polipropileno livre de DNA e RNA capacidade para 1,5 mL, submetidos a rotação de 13200 rpm, descartado o sobrenadante, adicionada 800 µL de água ultrapura, agitados por 10 segundos em vórtex, submetidos à rotação de 13200 rpm e descartado o sobrenadante novamente, adicionada 80 µL de água ultrapura e os tubos submetidos a temperatura de 96°C por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi colhido e armazenado em tubo de polipropileno livre de DNA e RNA à temperatura de -20°C^{24,25}.

PCR e detecção de genes de virulência de *Escherichia coli*: As amostras de DNA genômico, extraídas dos isolados foram submetidas a testes de PCR empregando-se diferentes pares de oligonucleotídeos para a detecção específica dos genes de virulência *iss* (Ewers et al., 2005)²⁶, *tsh* (Ewers et al., 2005)²⁶, *papC* (Rodriguez-Siek et al., 2005)²⁷ e *eae* (Yu et al., 1992)²⁸ (Quadro1). Cada reação de PCR foi efetuada baseada no protocolo de preparação do mix de reagentes e programas no termociclador Mastercycler Personal Eppendorf®, descritos pelos autores de cada par de *Primers*.

QUADRO 1 - Primers para detecção de genes de virulência de *E. coli* pela técnica de PCR.

Gene alvo	Sequência	Referência
<i>papC</i>	f 5'-TGATATCACGCAGTCAGTAGC-3' r 5'-CCGGCCATATTCACATAA-3'	Rodriguez-Siek et al. (2005) ²⁷
<i>iss</i>	f 5'-ATC ACA TAG GAT TCT GCC G-3' r 5'-CAG CGG AGT ATA GAT GCC A-3'	Ewers et al. (2005) ²⁶
<i>tsh</i>	f 5'-ACT ATT CTC TGC AGG AAG TC-3' r 5'-CTT CCG ATG TTC TGA ACG T-3'	Ewers et al. (2005) ²⁶
<i>eae</i>	f 5'-AAACAGGTGAACTGTTGCC-3' r 5'-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3'	Yu et al. (1992) ²⁸

Como controles positivos para as reações da PCR, foram utilizadas amostras de DNA genômico de referência para *E. coli* cedida pela professora Dr^a Terezinha Knöbl, da Universidade de São Paulo.

Resultados

Das 90 amostras submetidas a cultura bacteriológica, houve isolamento de 31 (34,3%) *E. coli* nos taiassuídeos do estudo, o que corresponde a 34,4% foram positivas para *E. coli* e *Salmonella* foi ausente em todas as amostras. Entre estes isolados 19 (n=31) eram procedentes de *P. tajacu* e 12 (n=31) de *T. pecari*, representando frequências de 61,3% e 38,7% respectivamente.

Dentre os 19 isolados de *E. coli* em *P. tajacu*, 15 apresentaram multirresistência e um isolado foi suscetível a todos antimicrobianos testados (Tabela 1). Nos isolados de *T. pecari*, seis apresentaram multirresistência (Tabela 2). Quanto ao IRA, 12 isolados de *E. coli* de *P. tajacu* foram considerados multirresistentes e sete isolados de *T. pecari*. Os isolados apresentaram taxas de resistência acima de 60% aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina e sulfonamida, sendo as taxas de sensibilidade superiores a 60% apenas em tetraciclina e ceftriaxona (Figura1).

TABELA 1 - Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de *E. coli* em *P. tajacu*.

Classificação da resistência	Números Padrões de resistência	%
Múltipla	4+	83,3
Tripla	1	5,5
Dupla	2	11,1

Perfil de Resistência	Padrões de Resistência	Número de Cepas
Múltipla	CLO TET NEO AMP AMO SUL SUT	1
Múltipla	DOX TET NEO AMP AMO SUL SUT	3
Múltipla	DOX TET NEO AMP AMO SUL	1
Múltipla	DOX TET AMP AMO SUL SUT	2
Múltipla	DOX TET NEO AMP AMO SUT	1
Múltipla	DOX TET NEO AMP SUL SUT	1
Múltipla	TET NEO AMP AMO SUL SUT	2
Múltipla	DOX TET NEO SUL SUT	1
Múltipla	TET AMP AMO SUL SUT	2
Múltipla	TET AMP AMO SUL	1
Tripla	CEF AMO SUL	1
Dupla	AMP SUL	1
Dupla	DOX TET	1

Legenda: AMO= Amoxicilina; AMP= Ampicilina; CLO=Cloranfenicol; CEF= Ceftriaxona; DOX= Doxiciclina; NEO= Neomicina; SUL= Sulfonamida; SUT=Sulfazotrim; TET=Tetraciclina.

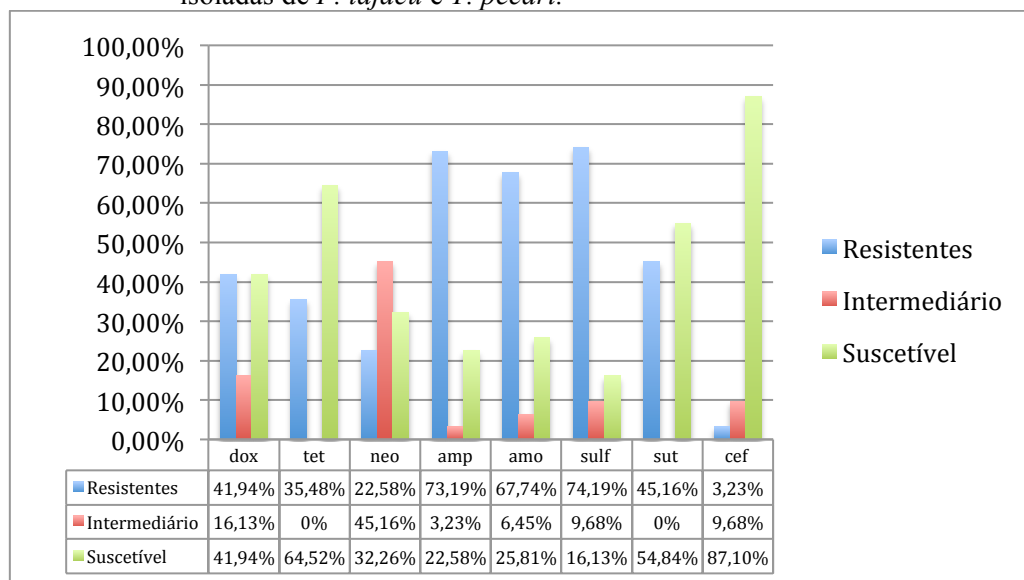
TABELA 2 - Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de *E. coli* em *T. pecari*.

Classificação da resistência	Números Padrões de resistência	%
Múltipla	4+	30
Tripla	3	40
Dupla	2	20
Simples	1	10

Perfil de Resistência	Padrões de Resistência	Número de Cepas
Múltipla	DOX TET AMP AMO SUL SUT	1
Múltipla	DOX TET NEO AMP AMO SUL	1
Múltipla	DOX TET AMP AMO SUL	1
Tripla	AMP AMO SUL	2
Tripla	DOX TET SUL	1
Tripla	AMP AMO SUL	1
Dupla	AMP AMO	1
Dupla	DOX TET	1
Simples	SUL	1

Legenda: AMO= Amoxicilina; AMP= Ampicilina; CLO=Cloranfenicol; CEF= Ceftriaxona; DOX= Doxiciclina; NEO= Neomicina; SUL= Sulfonamida; SUT=Sulfazotrim; TET=Tetraciclina.

FIGURA 1 - Resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de *E. coli* isoladas de *P. tajacu* e *T. pecari*.



Legenda: AMO= Amoxicilina; AMP= Ampicilina; CLO=Cloranfenicol; CEF= Ceftriaxona; DOX= Doxiciclina; NEO= Neomicina; SUL= Sulfonamida; SUT=Sulfazotrim; TET=Tetraciclina.

Em relação à características virulentas, um dos isolados apresentou β -hemólise e em oito isolados foi detectado ao menos um gene de virulência. O gene *papC* foi detectado em cinco isolados (16,12%), *iss* em quatro isolados (12,9%), *tsh* em um isolado (3,2%) e *eae* em

um isolado (3,2%). Também houve a presença de duas associações de genes de virulência (*eae* e *papC*, *iss* e *tsh*) (Quadro 2).

QUADRO 2 - Resultados positivos para genes de virulência e presença de hemolisina em *E. coli* isoladas de *T. pecari* e *P. tajacu*.

AMOSTRA	β Hemólise	GENES DE VIRULÊNCIA			
		<i>iss</i>	<i>tsh</i>	<i>papc</i>	<i>eae</i>
Tj8	-	-	-	+	-
Tc12	-	+	-	-	-
Tc16	-	-	-	+	-
Tc17	-	-	-	+	+
Pi1	-	-	-	+	-
Pi6	+	+	+	-	-
Pi8	-	+	-	-	-
Pi18	-	-	-	+	-

Legenda: T = *T. pecari*; P = *P. tajacu*.

Discussão

Na literatura consultada existe apenas o relato de isolamento de *E. coli* e *Salmonella* em *P. tajacu*, de forma simultânea, no Estado do Arizona (EUA)², entretanto não houve caracterização ou avaliação do perfil antimicrobiano destes isolados. *E. coli* é um habitante comum da microbiota intestinal, logo, o isolamento desta bactéria ocorre rotineiramente, enquanto *Salmonella* pode estar presente causando doença ou de forma inaparente em diversos animais²⁹.

Os resultados negativos para *Salmonella* neste trabalho são, portanto, semelhantes aos observados previamente, e indicam menor possibilidade de *T. Pecari* e *P. tajacu* atuarem como reservatório desta bactéria em criatórios comerciais no Estado de Goiás, diante das condições observadas. Apesar de isolamento frequente de *Salmonella* em várias espécies de animais silvestres, pode haver ampla variedade de prevalência de acordo com a espécie animal e condições estudadas^{26, 27}.

Apesar de nossos resultados negativos para *Salmonella*, um estudo no Brasil identificou esta bactéria em 25% de *P. tajacu* e *T. pecari* de cativeiro⁷, o que destaca a possibilidade da sua ocorrência nestes animais, mas ao mesmo tempo fica claro que condições ambientais, manejo dos animais e alimentos são pontos importantes para a infecção por

*Salmonella*³⁰. Ressalta-se que bactérias devem estar em quantidade suficiente e em formas cultiváveis para serem detectadas por técnicas de bacteriologia convencional, sorológicas ou moleculares³¹, fato este que pode explicar a ausência de *Salmonella* nas amostras obtidas de *T. pecari* e *P. tajacu*

Este estudo revelou elevada resistência para sulfametazona (74,19%), ampicilina (70,96%), amoxilina (67,74%), tetraciclina (67,74%), doxiciclina (48,38%) e sulfametopim (48,31%). Dentre as *E. coli* isoladas, apenas oito não apresentaram múltipla resistência. Tal achado está de acordo com vários estudos que demonstram um perfil de resistência aos antimicrobianos bastante extenso em animais domésticos^{32, 33, 34, 13}. Entretanto, em animais selvagens ainda há poucos relatos, mas que já indicam essa tendência provavelmente pela acentuada contaminação ambiental, de afluentes ou contato com animais domésticos e seus produtos que apresentam bactérias com genes relacionados a multirresistência^{10, 35, 36}.

O antimicrobiano que apresentou maior porcentagem de sensibilidade no antibiograma dentre todos testados foi a Ceftriaxona, com apenas um isolado apresentando resistência e dois apresentando suscetibilidade intermediária a este fármaco. A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração com amplo espectro de ação sobre bactérias Gram negativas. Sabe-se que a resistência aos antimicrobianos varia de acordo com a bactéria, e muitas vezes, o seu sorotipo. De acordo com o *Center of Diseases Control* (CDC)³⁷, a ocorrência de resistência à ceftriaxona é sempre de alta relevância, pois os isolados resistentes à droga possivelmente apresentam multirresistência e representam uma ameaça a saúde pública.

Uma amostra de *E. coli* isolada de *T. pecari* apresentou associação dos genes de virulência *eae* e *papC*, detendo portanto, importante potencial virulento. O gene *eae* tem sido bastante associado com EPEC e EHEC, e sua presença de forma isolada pode indicar patogenicidade em linhagens atípicas como já foi observado em surtos em seres humanos e neste caso é denominada aEPEC (atypical Enteric Pathogenic *Escherichia coli*)¹². Já o gene *papC* é associado a linhagens de *E. coli* que causam pielonefrite em humanos e animais³⁸.

Em amostras de *P. tajacu* isolou-se uma *E. coli* com a formação de β -hemólise em ágar BHI com sangue de carneiro. Neste isolado detectou-se os genes *iss* e *tsh*. A presença de dois ou mais genes de virulência, é uma situação que de acordo com Masters et al.³⁹ influi diretamente na capacidade virulenta do microrganismo. A atividade hemolítica é comum em casos de *E. coli* associadas à quadro de diarreia, a sua ausência na maioria das amostras isoladas pode ser pelo fato de não estar sendo expressa continuamente em bactérias comensais, mas não significa ausência de patogenicidade⁴⁰.

Os genes *iss*, *tsh*, *papC* e *eae*, entre outros genes de virulência, são encontrados em amostras patogênicas e potencialmente patogênicas em aves domésticas e silvestres¹⁰, assim como em suínos domésticos e selvagens^{41, 42}, seres humanos¹⁷ e em diversos reservatórios de água contaminados^{43, 12}. Em estudo realizado por Bonnet et al.³⁵ foi evidenciado que amostras comensais de *E. coli* apresentam menores frequências de genes de virulência, como os genes *tsh* e *iss*, entre outros genes de virulência, fato este que corrobora com os achados no presente estudo e já evidenciado em outros trabalhos semelhantes.

Deve-se ressaltar que a presença de um ou mais genes de virulência não indica a patogenicidade intrínseca da linhagem, a não ser que haja a uma combinação apropriada de VGs para causar doença em determinado hospedeiro^{44, 39}, como foi o caso observado em duas amostras, com a presença simultânea dos genes *eae* e *papC*, e os genes *iss* e *tsh*. Também, o fato de se encontrar a presença destes genes isolados, entre outras características fenotípicas, suscita a possibilidade de transferência lateral de elementos genéticos móveis (plasmídeos, ilhas de patogenicidade) e com isso o surgimento de novas e inesperadas cepas⁴⁵

Conclusões

- *Salmonella* sp. não é comumente isolada em amostras fecais de *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu* criados comercialmente no Estado de Goiás;
- *Escherichia coli* é isolada com frequência em amostras fecais *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu* criados comercialmente no Estado de Goiás;
- *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu* podem ser reservatórios de *E. coli* patogênicas e resistentes aos antimicrobianos de uso em humanos.

Referências

1. Mayor P, Le Pendu Y, Guimaraes DA, da Silva JV, Tavares HL, Tello M, Pereira W, Lopez-Béjar M, Jori F. A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. Research in veterinary science. 2006;81(2):246-253.
2. Shender LA, Glock RD, Spraker TR. Salmonellosis in a free-ranging population of javelinas (*Pecari tajacu*) in south central Arizona. Journal of wildlife diseases. 2009;45(4):941-951.
3. Vieira RFdC, Molento MB, Guimarães AMS, Santos APd, Bonat M, Javorouski ML, Popp L, Santos LCd, Moraes W, Cubas ZS. Use of a Mycoplasma suis-PCR protocol for screening a population of captive peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2011;20(1):75-77.
4. Coutinho TA, Moreno AM, Imada Y, Lopez RPG, Neto JSF. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from Brazilian *Tayassu pecari*. Tropical animal health and production. 2012;44(4):689-692.
5. de Castro AMMG, Brombila T, Bersano JG, Soares HS, Silva SOdS, Minervino AHH, Ogata RA, Gennari SM, Richtzenhain LJ. Swine infectious agents in *Tayassu pecari* and *Pecari tajacu* tissue samples from Brazil. Journal of wildlife diseases. 2014;50(2):205-209.

6. Snak A, Garcia FG, da Silveira Delgado LE, Osaki SC. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in wild animals living in the Cascavel city park, Paraná, Brazil. *Ocorrência de Cryptosporidium spp. em animais silvestres do Parque municipal de Cascavel, Paraná, Brasil*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 2015;36(6 suplemento 2):4323-4332.
7. Real VV, Dutra V, Nakazato L, Freitas TPTd, Keuroghlian A, Almeida AdBPFd, de Souza RL. PCR de " *Salmonella* " spp, " *Streptococcus suis* ", " *Brucella abortus* " e circovírus suíno tipo 2 em taiaçuídeos de vida livre e cativo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2010;11(3).
8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
9. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-140.
10. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Coelho AC, Matos M, Rojo-Bezares B, Rodrigues J, Torres C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microbial Drug Resistance*. 2008;14(1):71-77.
11. Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(18):5703-5710.
12. Hamilton MJ, Hadi AZ, Griffith JF, Ishii S, Sadowsky MJ. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water research*. 2010;44(18):5463-5473.
13. Ramos S, Silva N, Caniça M, Capelo - Martinez JL, Brito F, Igrejas G, Poeta P. High prevalence of antimicrobial - resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(3):517-526.
14. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. ed. editor^editors.: Artmed Editora; 2005. p.
15. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(9):722-732.
16. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013;152(1):2-12.
17. Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D, Zinke O, Ansorge H. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(19):5814-5829.
18. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual review of food science and technology*. 2016;7:287-312.
19. Sobestiansky J, Santin API, Pôrto RNG, Moreno AM, Souza MA, Barcellos D. Coleta de material para exames laboratoriais. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORENO, AM; SOBESTIANSKY, A. 2005:47-69.
20. ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo, V. 2016.
21. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008:120-126.
22. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;46(1):165-170.
23. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;dkq037.
24. Hooton SPT, Atterbury RJ, Connerton IF. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International journal of food microbiology*. 2011;151(2):157-163.
25. Silva IM, Evêncio-Neto J, Silva RM, Lucena-Silva N, Magalhães J, Baliza M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. *Arq. bras. med. vet. zootec*. 2011;63(2):333-339.

26. Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp H-C, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian diseases*. 2005;49(2):269-273.
27. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary research*. 2005;36(2):241-256.
28. Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular microbiology*. 1992;6(3):411-417.
29. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. ed. editor^editors.: John Wiley & Sons; 2011. p.
30. Kich JD, Cardoso M. Salomelose In: SOBESTIANSKY, Y.; BARCELLOS, D. Doenças dos suínos. Goiânia: Canône Editorial. 2012:257-264.
31. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10ª edição. Artmed editora SA Porto Alegre RS. 2012:226-239.
32. Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(5):1373-1380.
33. Wang X-M, Jiang H-X, Liao X-P, Liu J-H, Zhang W-J, Zhang H, Jiang Z-G, Lü D-H, Xiang R, Liu Y-H. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS microbiology letters*. 2010;306(1):15-21.
34. Prapasarakul N, Tummaruk P, Niyomtum W, Tripipat T, Serichantalergs O. Virulence genes and antimicrobial susceptibilities of hemolytic and nonhemolytic *Escherichia coli* isolated from post-weaning piglets in central Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2010;72(12):1603-1608.
35. Bonnet C, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(22):6955-6962.
36. Navarro-Gonzalez N, Casas-Díaz E, Porrero CM, Mateos A, Domínguez L, Lavín S, Serrano E. Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Veterinary microbiology*. 2013;167(3):686-689.
37. Centres for Disease C, Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. ed. editor^editors.: Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2013. p.
38. Ngeleka M, Brereton L, Brown G, Fairbrother JM. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian diseases*. 2002;46(1):143-152.
39. Masters N, Wiegand A, Ahmed W, Katouli M. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *water research*. 2011;45(19):6321-6333.
40. Schierack P, Weinreich J, Ewers C, Tachu B, Nicholson B, Barth S. Hemolytic porcine intestinal *Escherichia coli* without virulence-associated genes typical of intestinal pathogenic *E. coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(23):8451-8455.
41. Sánchez S, Martínez R, García A, Vidal D, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Herrera-León S, Echeita A. Detection and characterisation of O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary microbiology*. 2010;143(2):420-423.
42. Schierack P, Rödiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PloS one*. 2013;8(4):e59242.
43. Ahmed W, Tucker J, Bettelheim KA, Neller R, Katouli M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water research*. 2007;41(16):3785-3791.
44. Gilmore MS, Ferretti JJ. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science*. 2003;299(5615):1999-2002.
45. Bielaszewska M, Prager R, Köck R, Mellmann A, Zhang W, Tschäpe H, Tarr PI, Karch H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(10):3144-3150.

CAPÍTULO 3 – *Escherichia coli* E *Salmonella* sp. EM *Sus scrofa scrofa*, SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, DETECÇÃO GENES DE VIRULÊNCIA E DE RESISTÊNCIA

RESUMO

Suídeos selvagens têm o potencial de carrear grande diversidade de patógenos de origem alimentar como *Salmonella* e *Escherichia coli*, que podem causar graves enfermidades. Objetivou-se com o presente estudo pesquisar a presença de *E. coli* e *Salmonella* sp., determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a detecção de genes de virulência e resistência presentes nos isolados destas bactérias, provenientes de *Sus scrofa scrofa* em criatórios comerciais no Estado de Goiás. A coleta de 100 suabes retais de *S. scrofa*, resultou em um isolado de *Salmonella* e 57 isolados de *E. coli*. A amostra isolada de *Salmonella* foi identificada como sorotipo O: 6,8. Entre os genes de virulência e genes de virulência (*spvC*, *int11*, *rfbJ* e *prot6E*) e de resistência (*sul1*, *bla_{TEM}*, *qnrA* e *qnrB*) nenhum foi detectado no isolado de *Salmonella* deste estudo. Todas as amostras de *E. coli* apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, e foram detectados o gene de resistência sérica *iss* em quatro isolados, e os genes de virulência *papC* em sete isolados e o *tsh* em 17, com associações possivelmente patogênicas entre estes três genes. Não foi detectado gene de virulência *eae* nos isolados de *E. coli*, e em nenhum dos isolados houve a formação de beta hemólise no teste de hemólise. Conclui-se que há baixo isolamento de *Salmonella* em *S. scrofa* criados em cativeiro e grande quantidade de isolamento de *E. coli* potencialmente patogênicas e resistentes aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Enterobacteriaceas, javali, multirresistência, suínos selvagens.

Escherichia coli AND *Salmonella* sp. IN *Sus scrofa scrofa*, ANTIMICROBIAL PROFILE,
VIRULENCE AND RESISTANCE GENES DETECTION

ABSTRACT

Wild boars can potentially carry a huge diversity of food-borne pathogens that may cause serious diseases in humans, such as *Salmonella* and *E. coli*. The object of this study was to isolate and analyze the antimicrobial profile, as also to also detect virulence and resistance genes of *E. coli* and *Salmonella*, from *Sus scrofa scrofa* from commercial herds in Goiás State. It was collected 100 rectal swabs of healthy animals, that resulted in one *Salmonella* and 57 *E. coli* isolated. *Salmonella* were allocated in serotype O: 6,8, no virulence (*spvC*, *int11*, *rfbJ* e *prot6E*) or genes resistance (*sul1*, *bla_{TEM}*, *qnrA* e *qnrB*) were detected. All *E. coli* samples were multidrug resistant, and the serum resistance gene *iss* were detected in four isolates, virulence gene *papC* in seven isolates and *tsh* gene in 17 isolates. The *eae* virulence gene was not detected and no isolate presented beta hemolysis in hemolysis test. Also, possible pathogenic associations were seen among the three encountered genes. It can be conclude that there is a low isolation of *Salmonella* in *S. scrofa* from captivity and high frequency of *E. coli* isolation with potential pathogenic and multidrug resistance figures.

Key-words: Enterobacteriaceae, feral swine, mutidrug resistance, wild swine.

Introdução

Suídeos silvestres têm o potencial de carrear grande diversidade de patógenos de origem alimentar que podem causar graves enfermidades em humanos, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli* que são de importância ímpar em saúde pública¹. A criação comercial de javalis apresenta diversas semelhanças entre a criação comercial de suínos, entretanto, é evidente maior rusticidade e menor uso de medicamentos e vacinas de maneira geral na produção dos javalis. As diferenças na criação destes animais reflete em vários aspectos como taxa de crescimento e ganho de peso, e de especial interesse para estudos na microbiota intestinal².

A família *Enterobacteriaceae* contém várias bactérias que habitam o trato intestinal de humanos e animais. Estas incluem bactérias de espécies não patogênicas e patogênicas. A coexistência de várias espécies num mesmo ambiente expõe estes microrganismos a vários antibióticos, havendo potencial possibilidade de disseminação de fatores de resistência e virulência. *Salmonella* e *Escherichia coli* são bactérias intimamente relacionadas e compartilham ancestral em comum, que presume-se que fosse uma bactéria comensal do ambiente intestinal de animais³. Entretanto, a maioria das linhagens de *E. coli* são comensais, enquanto os membros do gênero *Salmonella* são patogênicos a diversos animais⁴.

As salmonelas podem causar manifestações clínicas sistêmicas ou localizadas, a depender dos sorotipos e animal acometido. Vários mamíferos, aves e répteis podem albergar a bactéria por longos períodos sem apresentar manifestações clínicas, fato esse que pode ser de grande relevância no surgimento de surtos de salmonelose⁵.

E. coli é uma bactéria que pode apresentar-se tanto apatogênica, sendo caracterizada como comensal e benéfica à microbiota intestinal, quanto patogênica e classificada conforme sua capacidade de causar doença nos animais. Vários patótipos são descritos em *E. coli* patogênicas: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EaggEC), uropatogênica (UPEC), entre outros específicos aos animais acometidos⁴.

Adicionalmente, a presença de alguns genes de virulência como: *pap* (pili associado à pielonefrite), *crl* (curli), *eae* (intimina), *iuc* (aerobactina) e *iss* (resistência sérica) são determinantes para a patogenia da doença, como demonstrados em estudos acerca desses genes em estirpes de *E. coli* isolados de animais com colibacilose⁶. Em *Salmonella*, tanto genes típicos do gênero como *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) e *invA* (*invasin*) quanto genes associados à *integrons* (*int*) e inúmeros fatores de virulência, são focos de pesquisa pela

presença trivial em cepas patogênicas desta bactéria⁷.

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno bastante estudado, e tem-se notado que ocorre em alta frequência no ambiente atingindo populações diretamente influenciadas pelo uso de antimicrobianos e populações selvagens, que em teoria, tem pouco contato com estes fármacos⁸. A presença de elementos genéticos que determinam a resistência bacteriana aos antimicrobianos é relatada tanto em nível cromossomal quanto em elementos móveis como plasmídeos e *transposons* em *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.^{9,10}.

As bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. são agentes patogênicos de alta relevância em saúde animal e pública. Podem produzir perdas econômicas vultuosas dentro dos sistemas de produção animal tanto por morbidade acentuada quanto pela mortalidade de animais. As doenças que podem causar nos animais podem ser desencadeadas por vários fatores incluindo características dos animais acometidos, má nutrição, manejo inadequado e patogenicidade específica da bactéria⁴.

Diversos estudos em áreas endêmicas a javalis suscitam a necessidade de avaliação de patógenos presentes nestes animais. No Brasil, esta espécie representa uma ameaça como fauna invasora e está presente em vários Estados da União causando grandes prejuízos na agropecuária. Objetivou-se com o presente estudo o isolamento, a identificação e a análise de perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, assim como a detecção de genes de virulência e resistência em *E. coli* e *Salmonella*, provenientes de javalis em criatórios comerciais no Estado de Goiás.

Material e Métodos

Local: As análises bacteriológicas foram conduzidas e realizadas nos Laboratórios de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

Amostras: As coletas foram realizadas nos dois criatórios comerciais existentes no Estado de Goiás, habilitados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) para criação e venda *Sus scrofa scrofa*. Toda a conduta experimental com os animais *in vivo* foi realizada com Autorização para atividade científicas fornecida pelo IBAMA (Anexo A) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA-UFG)(Anexo B).

Foram coletados 100 suabes retais no total. As coletas foram realizadas de forma aleatória em machos e fêmeas de diferentes faixas etárias. Todos os animais deste

experimento apresentavam-se hígidos. Com auxílio de técnicas de contenção física dos animais, procedeu-se a coleta de suabes retais que foram alocados em tubos contendo 10 mL de água peptonada a 1%, e mantidos sob refrigeração até o momento da realização de técnicas de processamento bacteriológico¹¹. Os suabes retais foram realizados de forma aleatória abrangendo machos e fêmeas de diferentes faixas etárias.

Pesquisa de *E. Coli* e teste de hemólise: As amostras de suabe retal em água peptonada a 1% foram incubadas a 37° C por 18-24 horas, sendo posteriormente fracionadas em aproximadamente 1mL, inoculadas em caldo de *Brain heart infusion* (BHI) e incubadas à 37° C/ 18-24Hs, e posteriormente plaqueadas em ágar MacConkey¹².

Foram selecionadas três a cinco Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e repicadas em tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), incubadas a 37°C, durante 24 horas. A identificação de *Escherichia coli* por testes bioquímicos fenotípicos, caracterizou-se por testes de motilidade, produção de indol, hidrólise de urease, H₂S, malonato, reação vermelho metila e reação no citrato de Simmons. Além desses testes, os isolados foram submetidos ao teste de hemólise, realizado em ágar BHI contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após semeadas, as placas foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs para avaliação de presença ou ausência de hemólise¹².

Isolamento e identificação de *Salmonella*: As amostras de suabe retal em água peptonada a 1% foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs, sendo posteriormente transferidos 1 mL dessa solução para 9 mL de caldo Selenito Cistina e 1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis, incubados à 37° C/ 18-24Hs. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas dos caldos supracitados foram plaqueadas por esgotamento em estrias, em duplicata para meios seletivos: Ágar Verde Brilhante e Hektoen, novamente incubado à 37° C/ 18-24Hs. Onde três a cinco unidades formadoras de colônia com características morfológicas de *Salmonella* foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), incubados à 37° C/ 18-24Hs. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos aos seguintes testes: teste uréase, produção indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste de malonato e citrato de Simmons¹⁹.

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos: O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco-difusão usando o meio de Muller-Hinton¹³.

Para *E. coli* e *Salmonella* foram utilizados os seguintes antimicrobianos: doxiciclina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), tetraciclina (30mcg), neomicina (30mcg), ceftriaxona (30mcg), ampicilina (10mcg), amoxicilina(3mcg), sulfonamida (300mcg), sulfazotrim (25mcg).

As placas contendo ágar Muller-Hinton e semeadas com a suspensão bacteriana e com discos de antimicrobianos foram incubadas à 37° C/ 18-24Hs. A leitura e interpretação dos diâmetros dos halos foram efetuadas segundo as diretrizes de CLSI¹³.

Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRA): O IRA foi calculado pela razão entre o número de classes de antimicrobianos contra as quais cada isolado é resistente e o número total de classes testadas (7 classes). Índices acima de 0,2 foram considerados como multirresistentes¹⁴.

Os perfis de multirresistência dos isolados diante dos diferentes antimicrobianos foram também avaliados. Os isolados que apresentaram resistência, simultânea, a mais de três antimicrobianos de diferentes grupamentos eram considerados multirresistentes¹⁵.

Determinação de sorotipos de *Salmonella*: O isolado de *Salmonella* foi submetido ao teste sorológico com soro polivalente anti-O. Após a confirmação foi enviado a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para tipificação.

Extração de DNA: Para extração de DNA de *E. coli*, isolado de *E. coli* foi inoculado em 4 mL de BHI e incubação à 37° C/ 18-24Hs, 1 mL foi transferido para. Após estes período, 1 mL foi transferido tubo de polipropileno livre de DNA e RNA, submetidos à rotação de 13200 rpm por X minutos, descartado o sobrenadante, adicionada 800 µL de água milique, agitados por 10 segundos em vortex, submetidos à rotação de 13200 rpm por X minutos e descartado o sobrenadante novamente, adicionada 80 µL de água milique e os tubos submetidos à temperatura de 96°C por 10 minutos. Ao final, coletou-se o sobrenadante e o armazenou tubo de polipropileno livre de DNA e RNA à -20°C^{16,17}.

Para a extração de DNA de *Salmonella* sp., isolado de *Salmonella* sp. foi inoculado em 9 mL de caldo Selenito-cistina e incubado à 37° C/ 18-24Hs. Após este período, 400µL da amostra foi acondicionada em tubo polipropileno livre de DNA e RNA com capacidade 1,5mL. A amostra foi centrifugada à rotação de 13200 rpm quatro minutos. O sobrenadante foi descartado e suspenso em 1mL de TE (100mL Tris/HcL 1m + 20µL de EDTA 0,5m + 9,880µL H₂O) a mistura foi levada ao vórtex por dez segundos e centrifugada à rotação de 13200 rpm por oito minutos. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi suspenso em 100µL de TE. A mistura foi levada ao vórtex por dez segundos e colocada em placa de aquecimento a 95°C por 20 minutos, aliquoteada e armazenada em tubo de polipropileno livre de DNA e RNA à -20°C em freezer para uso posterior¹⁸

PCR e detecção de genes de virulência de *Escherichia coli*: As amostras de DNA genômico, extraídas dos isolados foram submetidas a testes de PCR empregando-se diferentes pares de oligonucleotídeos para a detecção específica dos genes de virulência *iss*

(Ewers et al., 2005)¹⁹, *tsh* (Ewers et al., 2005)¹⁹, *papC* (Rodriguez-Siek et al., 2005)²⁰ e *eae* (Yu et al., 1992)²¹ (Quadro 1). Cada reação de PCR foi efetuada baseada no protocolo de preparação do mix de reagentes e programas no termociclador Mastercycler Personal Eppendorf®, descritos pelos autores de cada par de *Primers*.

QUADRO 1 - Primers para detecção de genes de virulência de *E. coli* pela técnica de PCR.

Gene alvo	Sequência	Referência
<i>papC</i>	f 5'-TGATATCACGCAGTCAGTAGC-3' r 5'-CCGGCCATATTACATAA-3'	Rodriguez-Siek et al. (2005) ²⁰
<i>iss</i>	f 5'-ATC ACA TAG GAT TCT GCC G-3' r 5'-CAG CGG AGT ATA GAT GCC A-3'	Ewers et al. (2005) ¹⁹
<i>tsh</i>	f 5'-ACT ATT CTC TGC AGG AAG TC-3' r 5'-CTT CCG ATG TTC TGA ACG T-3'	Ewers et al. (2005) ¹⁹
<i>eae</i>	f 5'-AAACAGGTGAACTGTTGCC-3' r 5'-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3'	Yu et al. (1992) ²¹

Como controles positivos para as reações da PCR, foram utilizadas amostras de DNA genômico de referência para *E. coli* cedida pela professora Dr^a Terezinha Knöbl, da Universidade de São Paulo.

PCR em tempo real para detecção de genes de virulência e resistência em *Salmonella*: Os ensaios de PCR em tempo real para detecção dos oito genes *spvC*, *int11*, *sul1*, *bla_{TEM}*, *rfbJ*, *prot6E*, *qnrA* e *qnrB* de *Salmonella* sp. (Quadro 2) foram realizados de acordo com Bugarel et al.¹⁰, Munoz et al.²², Malorny et al.²³ e Dheilly et al.²⁴. As amostras foram submetidas ao ensaio de presença e ausência em termociclador *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*) nas condições: pré PCR a 60°C por 30 segundos seguida de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (fase de desnaturação) e 60°C por 1 minuto e 60°C por 30 segundos para extensão. Utilizou-se o sistema TaqMan®, tendo sido necessários alguns ajustes no equipamento para se adequar aos filtros disponíveis, nos quais BHQ por foi substituído por TAMRA. Os resultados foram analisados pelo programa StepOne Software v2.1 (*Applied Biosystems*, California, EUA), adotando-se o grau de confiança em 95%.

QUADRO 2 - Primers usados para detecção de genes de virulência e resistência de *Salmonella* pela técnica de PCR em tempo real e referências

Gene alvo	Sequência	Referência
<i>spvC</i>	f 5'- AATGAACTACGAAGTGGGCG-3' r 5'-TCAAACGATAAAACGGTTCCTC-3' sonda FAM-ATGGTGGCGAAATGCAGAGACAGGC-BHQ	Bugarel et al. ¹⁰
<i>sulI</i>	f 5'-TCCTGACCCTGCGCTCTATC-3' r 5'-TGCGCTGAGTGCATAACCA-3' sonda ROX-ATTGCTGAGGCGGACTGCAGGC-BHQ	Bugarel et al. ¹⁰
<i>intI</i>	f 5'-TGGGCAGCAGCGAAGTC-3' r 5'-TGCGTGGAGACCGAAACC-3' sonda FAM-AGGCATTTCTGTCTGGCTGGCG-BHQ	Bugarel et al. ¹⁰
<i>blaTEM</i>	f 5'-CTGGATCTCAACAGCGG-3' r 5'-CAACACGGGATAATACCGC sonda FAM-AGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCG-BHQ	Bugarel et al. ¹⁰
<i>rfbJ</i>	Fw: 5'-GCATTACCACATCATCTAC-3' Rv: 5'-GCGATTAGAGCATGTATATG-3' Sonda: FAM-TCTCTTATCTGTTGCGCTGTTGT-BHQ	Munoz et al. ²²
<i>prot6E</i>	Fw: 5'- ATATCGTCGTTGCTGCTTCC -3' Rv: 5'- CATTGTTCCACCGTCACTTTG -3' Sonda: FAM-AGGCGCTCATCGGTCCTGTGT-BHQ	Malorny et al. ²³
<i>qnrA</i>	Fw: 5'- CTTCTTGATGGGCTCAGATC -3' Rv: 5'- CCAGATCGGCAAAGGTTAGG -3' Sonda: FAM-CAGCCCCGCAGATTGACCTGTTG-BHQ	Dheilly et al. ²⁴
<i>qnrB</i>	Fw: 5'- GTAGCGCATATATCACGAATACC -3' Rv: 5'- AGATCTGAACCACTGAACGTC -3' Sonda: FAM-ACCTGGGCACCTATCCAACGGTTT-BHQ	Dheilly et al. ²⁴

Resultados

Ao todo foram obtidos um isolado de *Salmonella* e 57 isolados de *E. coli* dentre 100 amostras coletadas de javalis.

A amostra isolada de *Salmonella* foi sorotipada como O: 6,8, e nenhum gene de virulência ou de resistência aos antimicrobianos foi detectado. O isolado de *Salmonella* apresentou suscetibilidade aos antimicrobianos ceftriaxona, doxiciclina, sulfametopim, resistência intermediária a neomicina, cloranfenicol e tetraciclina, e resistência à amoxicilina, ampicilina, sulfonamida.

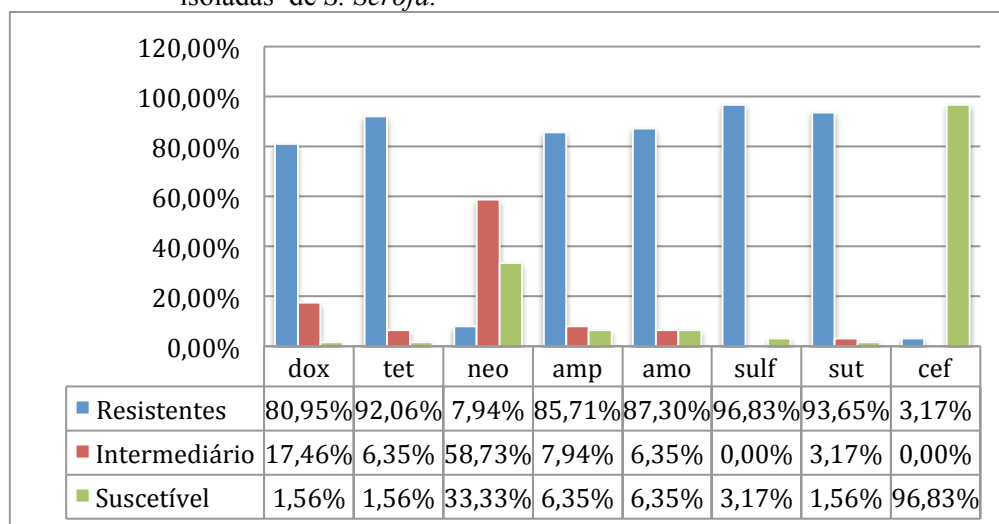
Dentre os 57 isolados de *E. coli*, 56 apresentaram multirresistência sendo resistentes a quatro ou mais antimicrobianos (Tabela 1), e todos os isolados com valores de IRA acima de 0,2. *E.coli* isoladas apresentaram altas taxas de suscetibilidade a Ceftriaxona (96,83%), com apenas duas amostras resistentes (3,17%) (Figura 1).

TABELA 1 - Distribuição dos padrões de resistência a nove antimicrobianos testados em isolados de *E. coli* em *S. scrofa*.

Classificação da resistência	Números Padrões de resistência	%
Múltipla	4+	98,2
Dupla	1	1,7

Perfil de Resistência	Padrões de Resistência	Número de Cepas
Múltipla	DOX CLO TET NEO AMP AMO SUL SUT	7
Múltipla	DOX TET CEF AMP AMO SUL SUT	1
Múltipla	DOX CLO TET AMP AMO SUL SUT	9
Múltipla	DOX TET NEO AMP AMO SUL SUT	8
Múltipla	DOX CLO NEO CEF AMO SUL SUT	1
Múltipla	DOX TET AMP AMO SUL SUT	20
Múltipla	DOX TET AMP SUL SUT	3
Múltipla	DOX CLO TET SUL SUT	1
Múltipla	DOX TET NEO SUL SUT	1
Múltipla	CLO TET AMP SUL SUT	2
Múltipla	DOX TET AMP AMO	1
Múltipla	DOX TET SUL SUT	1
Dupla	DOX TET	1

Legenda: AMO= Amoxicilina; AMP= Ampicilina; CLO=Cloranfenicol; CEF= Ceftriaxona; DOX= Doxiciclina; NEO= Neomicina; SUL= Sulfonamida; SUT=Sulfazotrim; TET=Tetraciclina.

FIGURA 1 - Resultados de testes de suscetibilidade a antimicrobianos de *E. coli* isoladas de *S. Scrofa*.

Legenda: AMO= Amoxicilina; AMP= Ampicilina; CLO=Cloranfenicol; CEF= Ceftriaxona; DOX= Doxiciclina; NEO= Neomicina; SUL= Sulfonamida; SUT=Sulfazotrim; TET=Tetraciclina.

Não houve β -hemólise em nenhum isolado de *E. coli*.

Quanto aos genes de virulência: detectou-se sete amostras com os genes *papC* (12,28%), quatro com *iss* (7,01%) e 17 com *tsh* (29,82%). O gene *eae* não foi identificado em nenhum isolado de *E. coli*. Foram observadas dois tipos de associação entre genes isolados: *iss* e *tsh*, com duas associações e *tsh* e *papC*, com três associações (Quadro 3).

QUADRO 3 - Resultados positivos dos genes de virulência *E. coli* isoladas de *S.scrofa*.

Amostra	GENE			
	<i>iss</i>	<i>tsh</i>	<i>papc</i>	<i>eae</i>
H4	-	+	+	-
H5	-	-	-	-
H6	-	-	+	-
H7	-	-	+	-
H17	+	-	-	-
H19	-	+	-	-
H21	+	+	-	-
H22	-	+	-	-
H23	+	+	-	-
H24	-	+	-	-
H26	-	+	+	-
H29	-	+	+	-
H48	-	+	-	-
H49	-	+	-	-
H50	-	+	-	-
H54	-	+	-	-
H60	-	+	-	-
H75	-	-	+	-
H76	-	-	+	-
H81	-	+	-	-
H83	-	+	-	-
H84	-	+	-	-
H85	-	+	-	-
G8	+	-	-	-

Discussão

Este é o primeiro estudo no Brasil a isolar bactérias *Salmonella* sp. e *E. coli* em javalis, e a caracterizar sua resistência a antimicrobianos e detectar a presença de genes de virulência. A premissa de que os javalis atuam como reservatórios de patógenos já é aceita em outros locais do mundo, citando que a presença destes animais de forma descontrolada é um agravante para a saúde animal e pública, inclusive causando prejuízos diretos a agropecuária como fauna invasora²⁵.

As bactérias *E. coli* e *Salmonella* são isoladas em diversos animais de forma simultânea. Em javalis, este isolamento bacteriano tem ocorrido frequentemente em estudos nos Estados Unidos da América²⁶, Argentina²⁷ e em vários países da Europa, sendo que inclusive há o registro de surtos de salmonelose e doença sistêmica por *E. coli* em seres humanos, associados a presença destes animais^{8,28-32}.

O isolado de *Salmonella* deste estudo possui fórmula antigênica O:6,8, sendo pertencente ao grupo C2³³. Este sorotipo se assemelha geneticamente à *Salmonella* Hadar, isolada com frequência em aves domésticas e com relatos da sua presença em suínos domésticos no Brasil³⁴. Nesses animais o sorotipo mais isolado nos últimos anos é *Salmonella* Typhimurium, em nível mundial^{5,16}, e estudos recentes com javalis selvagens também obtiveram o mesmo resultado^{30,31}.

A ausência na detecção de genes de virulência e resistência na PCR em tempo real do isolado de *Salmonella* pode ser explicada por possível generalidade da técnica de extração de DNA da amostra. Os genes de virulência *spvC* e de resistência *blaTEM* são plasmidiais¹⁰ e a utilização de técnicas que extraem DNA por lise do mesmo, podem diminuir a sensibilidade de detecção de genes³⁵. Além disso, sabe-se que em cepas isoladas de animais não domesticados há evidente limitação na quantidade de genes de virulência e resistência, como observado por Schierack et al.³² que compararam a presença de vários genes entre bactérias provenientes de suínos domésticos e javalis de vida livre. Evidenciou-se que em animais submetidos a sistemas de produção industrializados existem bactérias com maior quantidade de fatores de virulência e resistência, decorrente da maior pressão de seleção natural destes microrganismos.

O fato de todos os isolados de *E. coli* e *Salmonella* apresentarem múltipla resistência aos antimicrobianos infere uma situação alarmante, pois de forma inesperada, neste estudo, as taxas de resistência aos antimicrobianos foram muito altas (acima de 80% em seis princípios ativos diferentes), sendo comparáveis às observadas em estudos realizados com suínos domésticos^{36,37}. Contrariamente aos resultados observados no presente estudo, Literack et al.⁸ e Schierack et al. 2009³⁸ encontraram taxas de resistência a antimicrobianos como, Beta Lactâmicos e cefalosporinas, mais baixas em javalis caçados na Europa. Romer et al.², sugerem que em javalis de vida livre há menor exposição às bactérias contaminantes ambientais, inclusive aos coliformes presentes nas suas próprias fezes que em seus hábitos naturais de revirar a terra podem se contaminar e recontaminar.

Dois isolados de *E. coli* foram resistentes à ceftriaxona, sendo portanto o antimicrobiano que apresentou melhor resultado nos testes de antibiograma. Relatos de resistência à ceftriaxona são preocupantes do ponto de vista de saúde pública, pois provavelmente os isolados resistentes à esta droga apresentarão multirresistência a outros antimicrobianos^{39,40}.

Os javalis comerciais são criados de forma extensiva e com utilização limitada de antimicrobianos, possuem uma dieta mais variada e manejo menos frequente dos animais. Sugere-se que os resultados de altas taxas de resistência se devem pela contaminação ambiental⁴¹⁻⁴⁴ ou mesmo de alimentos por bactérias que podem transferir tanto características de virulência quanto as de resistência aos antimicrobianos^{32,45}.

A ausência de hemolisina é esperada em *E. coli* comensais, pois de acordo Wassenaar e Gunzer⁴⁶ a produção desta toxina por cepas comensais não é comum nos isolados de animais hígidos. A atividade hemolítica é comum em casos de *E. coli* patogênicas, muito

associada a linhagens uropatogênica especificamente, mas não sendo este o fator determinante e isolado desta característica nem mesmo inferindo que a ausência de hemolisina implique em ausência de patogenicidade⁶.

Nos isolados de *E. coli*, o gene de virulência *tsh* foi o mais detectado, seguido de *papC* e *iss*, respectivamente. Tanto em suínos domésticos quanto em javalis³² são encontrados esses genes em frequências que se assemelham às encontradas no presente estudo. A combinação de genes de virulência é um achado que pode influir diretamente na patogenicidade da bactéria⁴⁷, e a associação entre os genes *papC* e *tsh* é muitas vezes considerada patogênica⁴⁸ e encontrada rotineiramente em linhagens de *E.coli* diarreio gênicas⁴⁶.

A presença de genes de virulência de forma isolada é um achado de grande importância nos estudos sobre patogenicidade e monitoramento de bactérias e doenças, entretanto a afirmação sobre o potencial patogênico deve ser utilizada com cautela e testes laboratoriais confirmatórios em conjunto⁴¹. De acordo com Wassenaar & Gunzser⁴⁶, a presença de genes de virulência apenas é funcional quando presente em um completo locus genético. Os mesmos autores afirmam que *E. coli* comensais com a presença de vários genes de virulência podem estar presentes na microbiota intestinal mas sem causar quaisquer malefícios.

A detecção de patógenos de importância em saúde pública em javalis denota a seriedade em atividades de monitoramento sanitário e muitas vezes ambiental. Muitos trabalhos revelam a presença de *Salmonella* e *E. coli* em javalis, portanto levantando hipóteses de estes animais atuarem como potenciais fontes de infecção para outros animais e principalmente, para seres humanos.

Conclusões

- *Salmonella* sp. é uma bactéria isolada em baixa frequência em amostras fecais de javalis hígidos provenientes de criatórios comerciais em Goiás;
- *E. coli* é isolada com frequência elevada em amostras fecais de javalis hígidos provenientes de criatórios comerciais em Goiás;
- Javalis são potencialmente reservatórios de *E. coli* patogênicas e resistentes à antimicrobianos de uso em humanos, fato este que enaltece seu aspecto de importância em saúde pública.

Referências

1. Sannö A, Aspán A, Hestvik G, Jacobson M. Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157: H7 in wild boars. *Epidemiology and infection*. 2014;142(12):2542-2547.
2. Römer A, Wieler LH, Schierack P. Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli* strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions. *Veterinary microbiology*. 2012;161(1):122-129.
3. Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection*. 2003;5(11):977-989.
4. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. ed. editor^editors.: John Wiley & Sons; 2011. p.
5. Jackson PGG, Cockcroft PD. Handbook of pig medicine. ed. editor^editors.: Elsevier Health Sciences; 2007. p.
6. Schierack P, Weinreich J, Ewers C, Tachu B, Nicholson B, Barth S. Hemolytic porcine intestinal *Escherichia coli* without virulence-associated genes typical of intestinal pathogenic *E. coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(23):8451-8455.
7. de Oliveira AP, Sola MC, Feistel JC, Moreira NM, de Oliveira JJ. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. 2013.
8. Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H, Cizek A. Antimicrobial - resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended - spectrum beta - lactamases in wild boars. *Journal of applied microbiology*. 2010;108(5):1702-1711.
9. Fischer J, Rodríguez I, Baumann B, Guiral E, Beutin L, Schroeter A, Kaesbohrer A, Pfeifer Y, Helmuth R, Guerra B. blaCTX-M-15-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(11):2951-2958.
10. Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC microbiology*. 2011;11(1):1.
11. Sobestiansky J, Santin API, Pôrto RNG, Moreno AM, Souza MA, Barcellos D. Coleta de material para exames laboratoriais. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORENO, AM; SOBESTIANSKY, A. 2005:47-69.
12. ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo, V. 2016.
13. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008:120-126.
14. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;46(1):165-170.
15. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010:dkq037.
16. Hooton SPT, Atterbury RJ, Connerton IF. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International journal of food microbiology*. 2011;151(2):157-163.
17. Silva IM, Evêncio-Neto J, Silva RM, Lucena-Silva N, Magalhães J, Baliza M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. *Arq. bras. med. vet. zootec*. 2011;63(2):333-339.
18. Santos LRd, Nascimento VPd, Oliveira SDd, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro AR, Salle CTP, Lopes RFF. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2001;43(5):247-250.
19. Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp H-C, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian diseases*. 2005;49(2):269-273.

20. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary research*. 2005;36(2):241-256.
21. Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular microbiology*. 1992;6(3):411-417.
22. Muñoz N, Díaz-Osorio M, Moreno J, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N. Development and evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010;12(2):220-225.
23. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of microbiological methods*. 2007;70(2):245-251.
24. Dheilly A, Le Devendec L, Mourand G, Boudier A, Jouy E, Kempf I. Resistance gene transfer during treatments for experimental avian colibacillosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):189-196.
25. Jordt AM, Lange M, Kramer-Schadt S, Nielsen LH, Nielsen SS, Thulke H-H, Vejre H, Alban L. Spatio-temporal modeling of the invasive potential of wild boar—a conflict-prone species—using multi-source citizen science data. *Preventive veterinary medicine*. 2016;124:34-44.
26. Jay MT, Cooley M, Carychao D, Wiscomb GW, Sweitzer RA, Crawford-Miksza L, Farrar JA, Lau DK, O'Connell J, Millington A. *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(12):1908-1911.
27. Ballari SA, Cuevas MF, Cirignoli S, Valenzuela AEJ. Invasive wild boar in Argentina: using protected areas as a research platform to determine distribution, impacts and management. *Biological Invasions*. 2015;17(6):1595-1602.
28. Montagnaro S, Sasso S, De Martino L, Longo M, Iovane V, Ghiurmino G, Pisanelli G, Nava D, Baldi L, Pagnini U. Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of wildlife diseases*. 2010;46(1):316-319.
29. Sánchez S, Martínez R, García A, Vidal D, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Herrera-León S, Echeita A. Detection and characterisation of O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary microbiology*. 2010;143(2):420-423.
30. Vieira-Pinto M, Morais L, Caleja C, Themudo P, Torres C, Igrejas G, Poeta P, Martins C. *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(6):739-740.
31. Chiari M, Zanoni M, Tagliabue S, Lavazza A, Alborali LG. *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2013;55(1):1.
32. Schierack P, Rödiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PloS one*. 2013;8(4):e59242.
33. Grimont PAD, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. 2007;9.
34. Silva MCdSG, de Paulali FDAJ, Caramori RPMJG, KichIv JJD. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Orion*. 2009;1:2.
35. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of microbiological methods*. 2010;81(2):127-134.
36. Prapasarakul N, Tummaruk P, Niyomtum W, Tripipat T, Serichantalergs O. Virulence genes and antimicrobial susceptibilities of hemolytic and nonhemolytic *Escherichia coli* isolated from post-weaning piglets in central Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2010;72(12):1603-1608.
37. Guerra PR, Ferraz S, Campos T, Cardoso M. Perfil de resistência a antimicrobianos e avaliação da presença de grupos clonais em isolados de *Salmonella* Bredeney de linfonodos submandibulares de suínos e matéria-prima para fabricação de embutidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre. 2011;39:996.
38. Schierack P, Römer A, Jores J, Kaspar H, Guenther S, Filter M, Eichberg J, Wieler LH. Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(3):695-702.

39. Centres for Disease C, Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. ed. editor^editors.: Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2013. p.
40. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(17):1242-1249.
41. Ahmed W, Tucker J, Bettelheim KA, Neller R, Katouli M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water research*. 2007;41(16):3785-3791.
42. Hamilton MJ, Hadi AZ, Griffith JF, Ishii S, Sadowsky MJ. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water research*. 2010;44(18):5463-5473.
43. Schneider RN, Nadvorny A, Schmidt V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. *Biotemas*. 2011;22(3):11-17.
44. Cooley MB, Quiñones B, Oryang D, Mandrell RE, Gorski L. Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:30.
45. Schierack P, Steinrück H, Kleta S, Vahjen W. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(10):6680-6686.
46. Wassenaar TM, Gunzer F. The prediction of virulence based on presence of virulence genes in *E. coli* may not always be accurate. *Gut pathogens*. 2015;7(1):1.
47. Masters N, Wiegand A, Ahmed W, Katouli M. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *water research*. 2011;45(19):6321-6333.
48. Ngeleka M, Brereton L, Brown G, Fairbrother JM. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian diseases*. 2002;46(1):143-152.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade de animais no Brasil é uma característica elementar que deve ser preservada para gerações futuras. A utilização da fauna de forma comercial e racional traz benefícios econômicos em âmbito regional e mantém as populações silvestres sob segurança da extinção. O conhecimento sobre os agentes patogênicos presentes nos animais auxilia na prevenção de doenças nos animais e seres humanos mitigando prejuízos à saúde pública.

Com o objetivo de aprimorar os conhecimentos a respeito de microrganismos e doenças que acometem os animais, várias pesquisas são elaboradas como mecanismos de vigilância e monitoramento de doenças que têm alta possibilidade de desencadear surtos locais ou ainda, se disseminar de forma desenfreada.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que há um grande problema de contaminação ambiental e consequentemente troca de genes de resistência e de virulência entre bactérias. O risco de surgimento de novos patógenos se associa ao contato recorrente de microrganismos comensais com outros patogênicos, com inúmeras possibilidades que ocorrem ao acaso aparentemente.

A presença de cepas de *Salmonella* e *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos comuns é uma realidade preocupante para a saúde pública e animal. Sabe-se que o uso intensivo de antimicrobianos de maneira indiscriminada e profilática é um fator de grande relevância na seleção natural de bactérias mais resistentes. Conhecer os mecanismos, propriedades e estruturas bacterianas que têm importância na virulência de *Salmonella*, compõem pontos necessários no entendimento do comportamento da bactéria em seus hospedeiros.

O aprofundamento do conhecimento sobre os fatores de virulência e os genes ligados a resistência antimicrobiana, são essenciais para predição e prevenção de problemas futuros relacionados a microrganismo patogênicos e multirresistentes, bem como criação de técnicas e ferramentas acuradas para atuar no diagnóstico e controle de doenças. Novos estudos que elucidem o papel dos Suiformes como possíveis reservatórios e disseminadores de *E. coli* e *Salmonella* poderão revelar questões importantes no entendimento de patógenos nos animais.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÕES PARA PESQUISA CIENTÍFICA COM ANIMAIS SILVESTRES E EXÓTICOS



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50552-1	Data da Emissão: 23/11/2015 08:39	Data para Revalidação*: 22/12/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Adriana Marques Faria	CPF: 005.218.291-60
Título do Projeto: ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA SPP. EM SUÍFORMES NÃO DOMESTICADOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO ESTADO DE GOIÁS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	CNPJ: 01.567.601/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO EM ANIMAIS SILVESTRES/EXÓTICOS EM CATIVEIRO	09/2015	12/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de pesquisas e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exonera o pesquisador titular e os membros da sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, do do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites da unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2016, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade das populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta de descrição de informações relevantes que subsidiavam a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	GOIÂNIA	GO	Propriedades Comerciais de animais silvestres/exóticos	Faixa de UC Federal
2	GOIÂNIA	GO	PROPRIEDADE COMERCIAL	Faixa de UC Federal
3	HELIÓPOLIS	GO	PROPRIEDADE COMERCIAL	Faixa de UC Federal
4	GOIÂNIA	GO	PROPRIEDADE COMERCIAL	Faixa de UC Federal
5	GOIÂNIA	GO	PROPRIEDADE COMERCIAL	Faixa de UC Federal
6	GOIÂNIA	GO	PROPRIEDADE COMERCIAL	Faixa de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Taxidermia, Taxidermia, Taxidermia, Taxidermia, Taxidermia, Taxidermia

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

Código de autenticação: 46792899



Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50552-1	Data da Emissão: 23/11/2015 08:39	Data para Revalidação*: 22/12/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Adriana Marques Faria	CPF: 005.218.291-60
Título do Projeto: ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA SPP. EM SUÍFORMES NÃO DOMESTICADOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO ESTADO DE GOIÁS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	CNPJ: 01.567.601/0001-43

Material e métodos

1 Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Outras amostras biológicas (M, A, P, D, H, T, O, F, P, S)
2 Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta (bala de canhão, Pupa)
3 Método de marcação (Outros mamíferos)	Outros métodos de marcação (enumerar amostra, Microchip, Brinco)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	

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

Código de autenticação: 46792899



Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50552-1	Data da Emissão: 23/11/2015 08:39	Data para Revalidação*: 22/12/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Adriana Marques Faria	CPF: 005.218.291-60
Título do Projeto: ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA SPP. EM SUÍFORMES NÃO DOMESTICADOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO ESTADO DE GOIÁS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	CNPJ: 01.567.601/0001-43

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Gêdo.	Tipo de amostra	Gêdo.	Data

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

Código de autenticação: 46792899



Página 3/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50552-1	Data da Emissão: 23/11/2015 08:39	Data para Revalidação*: 22/12/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Adriana Marques Faria	CPF: 005.218.291-60
Título do Projeto: ESCHERICHIA COLI E SALMONELLA SPP. EM SUÍFORMES NÃO DOMESTICADOS EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DO ESTADO DE GOIÁS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	CNPJ: 01.567.601/0001-43

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 46792899



Página 4/4



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Goiânia, 14 de dezembro de 2015.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO
PROTOCOLO N. 102/15**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** *Escherichia coli* e *Salmonella spp* em suiformes não domesticados em criações comerciais do estado de Goiás.
- ☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Adriana Marques Faria
- ☐ **Pesquisadores Participantes:** Guido Fontgalland Coelho Linhares; Maria Auxiliadora de Andrade; Moema Pacheco Chediak Matos
- ☐ **Unidade onde será realizado:** Criatórios comerciais em Hidrolândia, Guapó, Itaberaí, Corumbá e Jataí
- ☐ **Data de apresentação a CEUA:** 04/12/2015

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Investigar a ocorrência de *Escherichia coli* e *Salmonella ssp.* em amostras de javalis, catetos e queixadas oriundos de criatórios comerciais localizados no Estado de Goiás. Almeja-se ainda, de identificar os sorotipos prevalentes, a suscetibilidade a agentes antimicrobianos e identificar os genes de virulência presentes nas amostras obtidas.

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**
Não existem.
- ☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**
Javali - *Sus scrofa* 75 machos e 75 fêmeas (150)
Queixada - *Tayassu pecari* 60 machos e 60 fêmeas (120)
Cateto - *Pecari tajacu* 15 machos e 15 fêmeas (30)
- ☐ **Espécie e número total de animais utilizados:**
300 animais família Suidae
- ☐ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**
Baías de madeira, piquetes, pastagens e baías de alvenaria, com número de animais/ambiente variável de 1 a 40. Dependente das condições do criatório comercial no qual se encontra os animais.
- ☐ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:**
Não se aplica.
- ☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:**
Metodologia adequada. Animais serão mantidos em manejo zootécnico e coleta de dados não prejudica os animais. Coleta de fezes e suabe retal feito por equipe treinada.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- ☐ **Método de eutanásia:** não se aplica. Animais permanecerão no criatório.
- ☐ **Destino do animal:** Permanecerão no criatório, seguindo processo de produção comercial.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

☐ **Quanto a documentos:**

Documentação Completa (Ficha de protocolo assinada, termo de responsabilidade assinado por todos, certidão de ata; termo de consentimento criatórios de Itaberaí, Goiânia, Guapó, Hidrolândia e Corumbáiba, autorização SISBIO e CD com os documentos escaneados e projeto de pesquisa)

☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:**

O principal risco existente envolve o manejo dos animais, que exige um profissional habilitado para sua contenção. O contato prolongado com animais e secreções pode representar um risco principalmente pelo fato da doença em questão ser de caráter zoonótico, entretanto esse risco será minimizado com a utilização de equipamentos de proteção individual e a utilização de uma equipe treinada para contenção e coleta de materiais.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em abril de 2017.

VI - Data da reunião: 14/12/2015

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFV