

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

***Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica
isoladas de animais selvagens de vida livre
e sua sensibilidade a antimicrobianos**

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

SÃO PAULO

2013

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

***Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica
isoladas de animais selvagens de vida livre
e sua sensibilidade a antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Vania Maria de Carvalho

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

SÃO PAULO

2013

Iovine, Renata de Oliveira.

Salmonella spp. e *E. coli* patogênica isoladas de animais selvagens de vida livre e sua sensibilidade a antimicrobianos / Renata de Oliveira Iovine - 2013.

53 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2013.

Área de Concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Profª. Drª. Vania Maria de Carvalho.

1. *Escherichia coli*. 2. *Salmonella*. 3. Animais selvagens. 4. Grupos filogenéticos. I. Título. II. Carvalho, Vania Maria de (orientador).

RENATA DE OLIVEIRA IOVINE

***Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica isoladas de animais selvagens de vida livre e sua sensibilidade a antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____
Professora Dra. Vania Maria de Carvalho

Universidade Paulista - UNIP

_____/_____
Professora Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho

Universidade Paulista - UNIP

_____/_____
Dra. Marina Galvão Bueno

Instituto Pri-Matas para Conservação da Biodiversidade

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Vania Maria de Carvalho, pela sabedoria transmitida, paciência, apoio e por acreditar em minha capacidade na realização do mestrado. Muito obrigada por tudo!

À Universidade Paulista em permitir o uso do laboratório de pesquisa para que fosse possível a realização do trabalho, além da oportunidade de obtenção do título de mestre.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro na compra de materiais que foram utilizados no presente estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por fornecer bolsa de mestrado.

À Ph.D., Fabiana Toshie de Camargo Konno, por apoiar e disponibilizar seu tempo e conhecimento contribuindo para a realização do meu trabalho.

Às funcionárias Cleide Marques da Silva Santana e Suzana Maria Bezerra que foram de grande importância, pois forneceram todos os materiais utilizados e sempre deram apoio quando necessário.

Especial agradecimento aos colaboradores, Marina Galvão Bueno, Claudia Filone, Flávia Miranda, Danilo Kluyber e Catia Dejuste, que ajudaram na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

À bióloga, MSc, Lika Osugui, por transmitir seus conhecimentos que foram de grande valia para a realização desse trabalho.

Agradeço ainda a meus pais, irmãos e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram na concretização desta etapa de minha vida.

RESUMO

Medicina da Conservação (*One world, One health*) é a área da ciência que comprehende o estudo das doenças que resultam da interação entre o homem, animais e meio ambiente. Dentre as bactérias com potencial zoonótico encontram-se *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., empregadas também como medidas de contaminação ambiental e/ou ação antrópica. O objetivo deste trabalho foi a pesquisa de *E. coli* patogênicas e *Salmonella* spp., e sua resistência a antibacterianos, em mamíferos selvagens capturados em quatro diferentes áreas naturais brasileiras. Foram coletados *swabs* retais de 66 animais de diferentes espécies, processados segundo protocolos já estabelecidos para o isolamento de *E. coli* e *Salmonella*. As cepas foram analisadas quanto à resistência a antimicrobianos de acordo com padronização internacional. Para as *E. coli*, foram pesquisados, através de PCR, genes referentes às cepas diarreogênicas, ExPEC e grupos filogenéticos. Foram isoladas quatro cepas de *Salmonella enterica*, sorotipos 60:r:e,n,z15, Belem, Newport e Carrau, sendo este último multirresistente. Oitenta e seis cepas de *E. coli* foram isoladas e as provenientes de animais do Parque Estadual da Cantareira (São Paulo) apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados; 51,5% e 35,0% dos isolados dos animais, respectivamente, de Nhecolândia (Pantanal) e Parque Estadual da Serra da Tiririca/Reserva Ecológica Darcy Ribeiro (Rio de Janeiro), não apresentaram os genes pesquisados, sendo 20 o percentual de cepas negativas em Santa Isabel do Rio Negro (Amazônia). O grupo filogenético B1 foi prevalente entre os isolados (42,0%). Acima de 50,0% das cepas isoladas de todos os locais foram resistentes a antimicrobianos, especialmente β -lactâmicos, onde quatro cepas de *E. coli* obtidas de animais do Parque Estadual da Cantareira, local com alta ação antrópica, apresentaram multirresistência. A intensa ação humana pode levar à contaminação ambiental por cepas resistentes e/ou com potencial patogênico que, por sua vez, podem ser transmitidas para os animais selvagens.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Salmonella*, animais selvagens, resistência a antimicrobianos, genes de virulência, grupos filogenéticos

ABSTRACT

Conservation Medicine (One World, One Health) is the area of science that involves the study of diseases resulted from the interaction among man, animals and the environment. *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. are among the bacteria with zoonotic potential, which can also be used as a measurement of environmental contamination and/or anthropogenic activities. The objective of this study was the detection of pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. as well as the resistance to antibacterial in mammals captured in four different natural areas of Brazil. Rectal swabs were collected from 66 animals of different species, and were processed according to established protocols for *E. coli* and *Salmonella* isolation. The strains were analyzed for the resistance to antibacterial according to international standards. For *E. coli* it was screened by PCR, genes related to diarrheagenic strains, ExPEC and phylogenetic groups. Were isolated four strains of *Salmonella enterica*, serotype 60: r: e, n, z15, Belem, Newport and Carrau, the latest being MDR. Eighty-six strains of *E. coli* were isolated and all animals from Cantareira State Park (São Paulo) had at least one gene; 51,5% and 35,0% from the isolated animals, respectively, of Nhecolândia (Pantanal) and Serra da Tiririca State Park/Ecological Reserve Darcy Ribeiro (Rio de Janeiro), showed no genes surveyed, 20 percentage of negative strains in Santa Isabel do Rio Negro (Amazon). The phylogenetic group B1 was the most prevalent among the isolates (42,0%). Over 50,0% of the strains isolated from all sites were resistant to antibacterial, especially β -lactams, which four strains of *E. coli* obtained from animals in Cantareira State Park, local with high anthropic action, showed multidrug resistance. It is concluded that the intense human action can lead to environmental contamination caused by resistant strains and/or pathogenic potential which, in turn, can be transmitted to wild animals.

Keywords: *Escherichia coli*, *Salmonella*, wild animals, antibacterial resistance, virulence genes, phylogenetic groups

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<u>Figura 1.</u> : Mapa do Brasil, em destaque vistas aéreas das regiões de A- Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) - Amazônia; B- Parque Estadual da Serra da Tiririca e a Reserva Ecológica Darcy Ribeiro PEST/REDR) – Rio de Janeiro; C- Nhecolândia (NHE) – Mato grosso do Sul; D- Parque Estadual da Cantareira (PEC) – São Paulo.....	20
<u>Figura 2.</u> : Árvore dicotômica para classificação filogenética de <i>E. coli</i> , através da utilização de resultados de PCR para os genes <i>chuA</i> e <i>yjaA</i> e para o fragmento TspE4.C2 (Fonte: Clermont <i>et al.</i> , 2000).....	25
<u>Figura 3.</u> : Número absoluto de cepas positivas para os respectivos genes de virulência, isoladas dos animais selvagens, capturados em diferentes sítios geográficos (SIRN; NHE; PEST/REDR; PEC).....	27
<u>Figura 4.</u> : Percentual de cepas pertencentes aos respectivos grupos filogenéticos, isoladas dos animais selvagens, capturados em diferentes sítios geográficos (SIRN; NHE; PEST/REDR; PEC).....	33
<u>Figura 5.</u> : Percentual de cepas de <i>E. coli</i> resistentes aos antimicrobianos, isoladas de animais selvagens dos quatro biomas estudados.....	34

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1.</u> : Origem, espécie animal, sorotipo e resistência a antimicrobianos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> obtidas de animais selvagens.....	26
<u>Tabela 2.</u> : Presença de genes de virulência, grupo filogenético e sensibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de animais selvagens.....	28
<u>Tabela 3.</u> : Comparação entre os biomas estudados em relação à resistência e marcadores de virulência das cepas de <i>E. coli</i> obtidas dos animais selvagens.....	33
<u>Tabela 4.</u> : Multirresistência em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de animais selvagens do PEC e sua relação com genes de virulência e grupo filogenético.....	35

LISTA DE QUADROS

<u>Quadro 1.</u> : Espécies animais amostradas em suas respectivas áreas de colheita e biomas, as licenças ambientais e a ação antrópica exercida nessas áreas.....	19
<u>Quadro 2.</u> : Sequência, tamanhos dos amplificados e temperatura de anelamento dos iniciadores para a pesquisa de <i>E. coli</i> patogênicas.....	23
<u>Quadro 3.</u> : Sequência de cada iniciador para a pesquisa de grupos filogenéticos.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

ColV – colicina V

DAEC - difusamente aderentes *Escherichia coli*

EAEC – enteroagregativas *Escherichia coli*

E. coli – *Escherichia coli*

EHEC – enterohemorrágicas *Escherichia coli*

EIEC – enteroinvasivas *Escherichia coli*

EPEC - enteropatogênicas *Escherichia coli*

ETEC - enterotoxigênicas *Escherichia coli*

ExPEC - *Extraintestinal pathogenic E. coli*

FV – fator de virulência

ITU – infecção do trato urinário

NHE – Nhecolândia

PAI – ilha de patogenicidade

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PEC – Parque Estadual da Cantareira

PEST/REDR - Parque Estadual da Serra da Tiririca e a Reserva Ecológica Darcy Ribeiro

SHU – síndrome hemolítica urêmica

SIRN – Santa Isabel do Rio Negro

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2. INTRODUÇÃO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Regiões de colheita de material e espécies de animais amostradas	18
3.2. Processamento das amostras.....	20
3.2.1. Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	20
3.2.2. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp.	21
3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	21
3.4. Pesquisa de fatores de virulência (FV) em isolados de <i>E. coli</i>	22
3.5. Classificação dos Isolados de acordo com os grupos filogenéticos.....	24
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	36
6. REFERÊNCIAS	44

1. REVISÃO DE LITERATURA

Uma das importantes áreas que emergiram na última década como objeto de preocupação e investigação científica é a da Medicina da Conservação, compreendendo o estudo das doenças resultantes da interação entre o homem, os animais e o meio ambiente, surgindo o conceito *One world, One health*. O crescimento da população humana, a degradação ambiental, a contaminação da água e do solo são questões que se imbricam e se somam na ocorrência de patógenos que podem acometer esses três elos, tendo os animais selvagens grande importância nesse processo, seja como sentinelas de doenças infecciosas, parasitárias ou decorrentes da contaminação ambiental por substâncias tóxicas, seja como transmissores de alguns patógenos (WEINHOLD, 2003; RABINOWITZ *et al.*, 2009; SIEMBIEDA, *et al.*, 2011; TOMPIKINS *et al.*, 2011).

Devido à capacidade inerente a alguns patógenos, de parasitarem diferentes hospedeiros, alterações ambientais promovidas pela ação antrópica podem causar perturbações no ecossistema, modificando a disponibilidade dos patógenos e vetores e a susceptibilidade dos hospedeiros, podendo levar, indiretamente, à disseminação de doenças (FRIGGENS; BEIER, 2010; TOMPIKINS *et al.*, 2011).

Dentre as bactérias, com potencial zoonótico, que podem servir também como medidas de contaminação ambiental e/ou ação antrópica, encontram-se a *Salmonella* spp. e a *Escherichia coli* (CARVALHO, 2007). Ambas pertencem à família Enterobacteriaceae e estão relacionadas tanto à gastroenterites como a processos sistêmicos no homem e animais (KAPER *et al.*, 2004; HOELZER *et al.*, 2011).

A *Salmonella* spp. é considerada um patógeno primário, e os animais e os humanos podem carreá-la sem que apresentem qualquer sinal clínico de doença, possibilitando sua disseminação. A ocorrência de situações que levam à quebra da imunidade pode resultar no desenvolvimento de diversas manifestações clínicas como, enterites, abortamento e septicemias (RUNKEL *et al.*, 1991; JIJÓN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Autores de diferentes países têm demonstrado que répteis, aves e mamíferos de vida livre podem albergar *Salmonella* spp., inclusive de sorotipos frequentemente

encontrados como agentes de doença humana (LEE *et al.*, 2011; FOTI *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011)

A disseminação de sorotipos de *Salmonella* spp. oriundos de animais selvagens para os animais domésticos ocorre devido à proximidade destes grupos de animais, compartilhando o mesmo ambiente, com possível ocorrência da via inversa. A infecção, principalmente de animais de produção, pode levar à contaminação de suas carcaças e, por consequência, à infecção humana; da mesma forma, animais de produção podem contaminar o solo e a água utilizada para a manutenção da vida selvagem contribuindo na disseminação desse patógeno no ambiente (LEJEUNE *et al.*, 2004; JIJÓN *et al.*, 2007).

As *Escherichia coli* são consideradas comensais intestinais do homem e de outros animais de sangue quente, porém, cepas com potencial patogênico, que surgiram durante o processo evolutivo da espécie, apresentam fatores de virulência (FV) e são capazes de causar tanto doenças entéricas como extraintestinais (KAPER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007; BÉLANGER *et al.*, 2011).

As *E. coli* diarreogênicas são subdivididas em seis categorias: enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroaggregativas (EAEC), enteroinvasivas (EIEC) e difusamente aderentes (DAEC) (NATARO ; KAPER, 1998), devendo-se enfatizar que as EPEC e as EHEC têm sido relacionadas ao homem e aos animais selvagens, merecendo destaque do ponto de vista da Medicina da Conservação.

As EPEC são importante causa de diarreia e mortalidade em crianças menores de um ano, em países em desenvolvimento. Essas têm, como ponto central de sua patogênese, a capacidade de ocasionar a lesão “*attaching and effacing*”, relacionada ao gene *eae* (NATARO; KAPER, 1998; CHANDRA *et al.*, 2012). Em relação aos animais selvagens, *E. coli* com capacidade de “*attaching and effacing*” tem sido caracterizada como agente etiológico de doença em primatas não humanos (MANSFIELD *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003) tendo sido também isolada de animais de vida livre sadios, como aves, cervídeos e leões marinhos (OH *et al.*, 2011; CARRASCO *et al.*, 2011; OBWEGESER *et al.*, 2012).

As EHEC são um subgrupo das STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga) e uma das categorias mais estudadas, pois podem resultar em doenças graves como colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica (SHU), doença com elevado índice de fatalidade para o homem, especialmente crianças, idosos e imunodeficientes (MORA *et al.*, 2004). Apresentam alguns marcadores de virulência, entre eles os genes *eae* (ligado à capacidade de produzir a lesão de “*attaching and effacing*”, ocasionando alteração no citoesqueleto da célula epitelial) e *stx1/stx2* (genes que codificam a produção de toxinas de Shiga).

Na literatura, encontram-se estudos demonstrando que os ruminantes, principalmente o gado bovino, são considerados hospedeiros naturais, pois cepas de EHEC são encontradas em fezes de animais sadios (NATARO ; KAPER, 1998; RAMACHANDRAN *et al.*, 2003). Autores têm demonstrado a presença desse patógeno em animais selvagens, alguns deles vivendo em proximidade com o gado bovino. Doença humana já foi relacionada à ingestão de carne de caça, sugerindo que animais selvagens possam ser hospedeiros desses patógenos (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

As cepas de *E. coli* envolvidas em processos fora do sítio intestinal recebem a designação genérica de ExPEC (“*Extraintestinal pathogenic E. coli*”) (RUSSO; JOHNSON, 2000). Dentre as doenças extraintestinais destacam-se as infecção urinárias, pneumonias, meningites e septicemias (SMITH *et al.*, 2007; CARVALLO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

Para que essas bactérias se disseminem para outros sítios no hospedeiro, são necessários FV, entre eles adesinas, sideróforos, fatores de evasão do sistema imune, toxinas, entre outros, codificados em ilhas de patogenicidade cromossomal e/ou em plasmídeos (POLLARD *et al.*, 1990; LE BOUGUENEC *et al.*, 1992; JOHNSON; STELL, 2000).

Estudos demonstram o isolamento de *E. coli* capaz ocasionando infecção extraintestinal, em animais de produção, de companhia, selvagens e humanos, onde algumas cepas são comuns entre os hospedeiros, o que evidencia a transmissão do

homem para animais e vice-versa, tendo o ambiente como possível via para essa transmissão (BÉLANGER *et al.*, 2011).

São escassos os relatos de ExPEC causando doenças em animais selvagens (CARVALLO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012), embora doenças extraintestinais, com o isolamento de *E. coli*, tenham sido publicados (SCIMECA *et al.*, 1990; NDUNG'U *et al.*, 2003; ORÓS *et al.*, 2004). Em relação aos animais de vida livre, estudos do grupo publicados mostram que aves selvagens de ambientes insulares albergam cepas de ExPEC com alto potencial patogênico para animais e homem, além de apresentarem níveis elevados de resistência a antimicrobianos (CARVALHO, comunicação pessoal).

A diversidade genética dentro da espécie *E. coli* e a observação de que os diferentes patótipos apresentam perfis de virulência distintos, proporcionou a busca de técnicas que possibilitessem a classificação de grupos filogenéticos e a diferenciação entre as cepas comensais e patogênicas (CLERMONT *et al.*, 2000). Análises filogenéticas realizadas têm demonstrado que as *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais: A, B1, B2 e D, em que as cepas patogênicas, especialmente as que causam doença extraintestinal, pertencem ao grupo B2 e, em menor grau, ao D, enquanto cepas comensais ou menos virulentas aos grupos A e B1 (SCHIERACH *et al.*, 2008).

Os antibacterianos são as drogas mais indicadas para o tratamento de doenças bacterianas, porém a sua utilização indiscriminada nas últimas décadas resultou na disseminação de resistência, tanto em bactérias presentes nos hospitais como em isolados da comunidade e do ambiente (NEGREANU *et al.*, 2012).

A eliminação de lixo, esgoto e dejetos humanos e de animais domésticos, especialmente animais de criação, cuja utilização de antimicrobianos como profilaxia de doenças e promotores de crescimento é prática comum, pode levar a contaminação de ambientes naturais por cepas patogênicas ou não, resistentes a antimicrobianos (SAYAH *et al.*, 2005; DELSOL *et al.*, 2010). A utilização de excretas de animais de criação como fertilizantes favorecem a contaminação ambiental, além

das fontes de água, possibilitando maior transmissão de bactérias resistentes (BLANCO *et al.*, 2009).

A resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas da água e do solo pode aumentar com o impacto antropogênico, uma vez que a pressão seletiva exercida pelas práticas acima descritas pode auxiliar na seleção de cepas que já apresentavam resistência natural, ou ainda, favorecer a ocorrência de transferência da resistência entre as bactérias (SAYAH *et al.*, 2005; DELSOL *et al.*, 2010). Por isso, os ambientes aquáticos e terrestres podem servir como meio de disseminação dessas cepas resistentes e os animais selvagens podem fazer parte desse ciclo (NEGREANU *et al.*, 2012).

E. coli, sendo a principal enterobactéria presente no conteúdo intestinal, tem sido frequentemente utilizada como indicador de resistência a antibióticos em uma dada população animal e/ou espaço geográfico (GUENTHER *et al.*, 2010). Ambientes onde o adensamento humano permite a proximidade de áreas urbanas e naturais, ou locais onde animais selvagens convivem com animais domésticos são importantes sítios de investigação sobre a presença de patógenos com potencial zoonótico e/ou resistentes a antibióticos (GUENTHER *et al.*, 2011).

Poucas são as pesquisas que têm como foco o estudo da interface entre animais selvagens, domésticos e humanos, no tocante a patógenos com potencial zoonótico e/ou resistência a antibióticos. A pesquisa de patógenos específicos em animais selvagens capturados nessas áreas naturais, pelas características acima referidas, pode se prestar a este objetivo.

2. INTRODUÇÃO

A diminuição do habitat natural dos animais selvagens, observada nas últimas décadas, como consequência do desmatamento, queimadas e crescimento populacional, resultou no aumento da interação entre esses e os homens, acarretando na possível transmissão de patógenos entre estes. Além do contato direto, a contaminação do solo e água, principalmente pela ação antrópica, pode disseminar pelo meio ambiente agentes infecciosos (RABINOWITZ *et al.*, 2009; SIEMBIEDA, *et al.*, 2011; TOMPIKINS *et al.*, 2011).

Dentre as bactérias com potencial zoonótico está a *Escherichia coli*, espécie que pode ser dividida em cepas comensais e patogênicas, e a *Salmonella* spp., considerada patógeno primário (CARVALHO, 2007).

O gênero *Salmonella* apresenta duas espécies, a *S. enterica* e *S. bongori*, ambas capazes de invadir as células hospedeiras, porém só a *S. enterica* tem a capacidade de se disseminar sistematicamente (LAN *et al.*, 2009). A disseminação de sorotipos de *Salmonella* oriundos de animais selvagens para os animais domésticos e homem, e vice-versa, pode advir da contaminação do solo e da água, contribuindo para a disseminação deste patógeno no ambiente (LEJEUNE *et al.*, 2004; JIJÓN *et al.*, 2007).

A aquisição de genes de virulência por amostras originalmente comensais de *E. coli* resultou em cepas patogênicas, e levou ao surgimento de síndromes intestinais e extra-intestinais. Portanto, a pesquisa desses genes é uma ferramenta importante para a caracterização dos isolados (KAPER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007; BÉLANGER *et al.*, 2011). Além disso, as *E. coli* podem ser classificadas em quatro principais grupos filogenéticos, A, B1, D e B2, sendo que a maioria das cepas com potencial patogênico se enquadra principalmente nos grupos B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2000; SCHIERACH *et al.*, 2009).

Outra medida indireta da ação antrópica no meio ambiente é a resistência a antibacterianos observada em cepas isoladas de animais selvagens. Esta pode ser resultado da utilização dessas drogas como profilaxia de doenças e promotor de

crescimento em criação de animais, além do seu uso indiscriminado em Saúde Pública, onde o princípio ativo pode contaminar o meio ambiente através de dejetos (SAYAH *et al.*, 2005; DELSOL *et al.*, 2010; NEGREANU *et al.*, 2012).

Foi objetivo do presente trabalho, a pesquisa de *E. coli* patogênica e *Salmonella* spp., e sua resistência a antibacterianos, em mamíferos selvagens capturados em diferentes áreas naturais brasileiras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Regiões de colheita de material e espécies de animais amostradas

Para a realização da pesquisa foram colhidas amostras de animais selvagens, em quatro diferentes regiões (figura 1 e quadro 1).

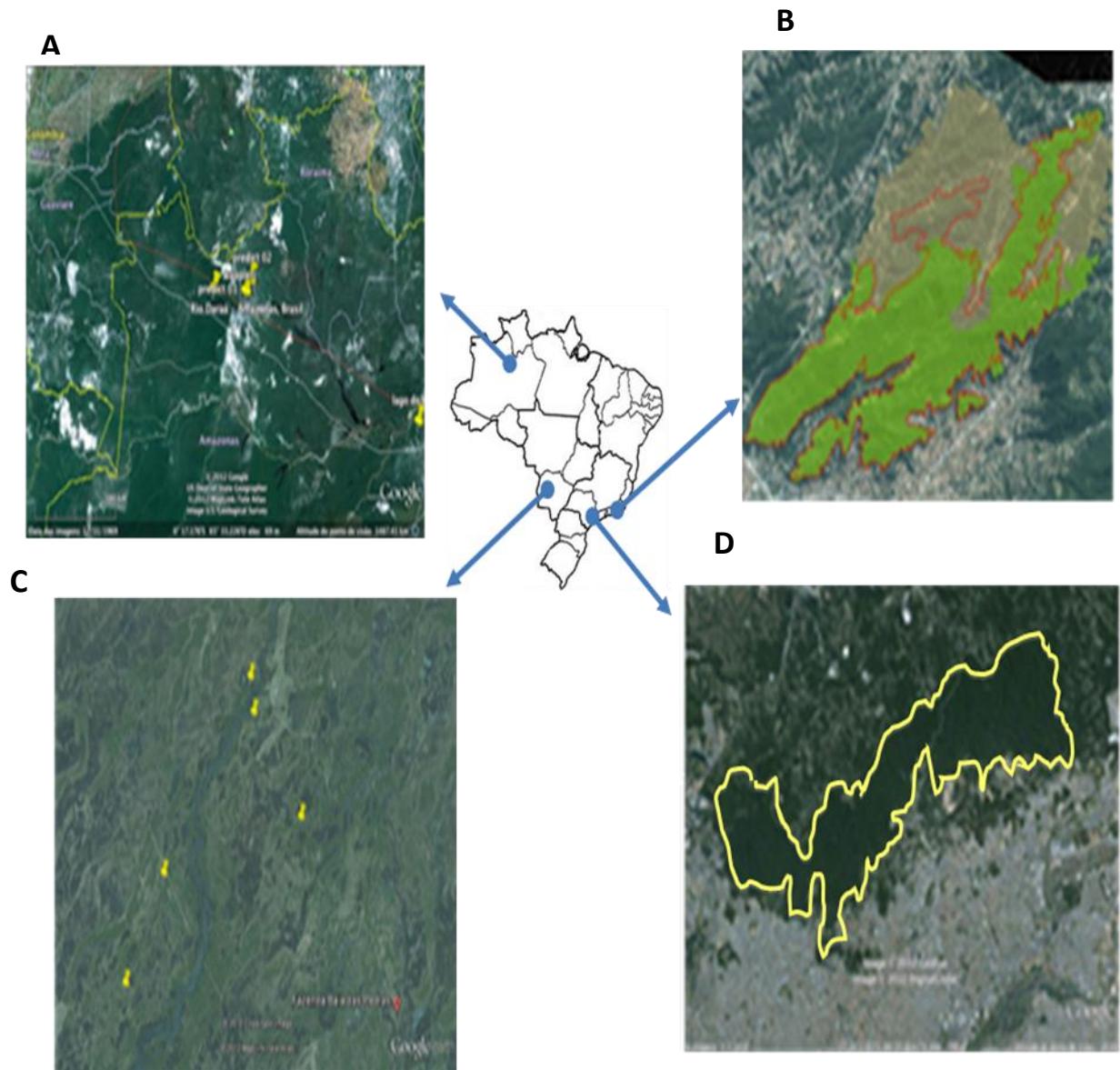
Foram coletados dois *swabs* retais de 66 animais. Todos os animais foram contidos quimicamente para a colheita dos materiais, de acordo com os protocolos utilizados pelos responsáveis das parcerias recomendados para cada espécie, e autorizado pelas licenças ICMBIO/SISBIO, minimizando o estresse para os mesmos.

Quadro 1. Espécies de animais amostradas em suas respectivas áreas de colheita e biomas, as licenças ambientais e a ação antrópica exercida nessas áreas

LOCAL	Municípios/ Estado	Bioma	Sítio de Colheita	Ação antrópica no local	No. de amostras/ Espécie animal	Licenças
Parque Estadual da Cantareira (PEC)	São Paulo, Caieiras, Mairiporã e Guarulhos/ SP	Mata Atlântica	Núcleo Pedra Branca e Núcleo Cabuçu	Alta	10 quatins (<i>Nasua nasua</i>), 3 gambás (<i>Didelphis marsupialis</i>), 1 cuica (<i>Monodelphis domestica</i>)	ICMBIO, SISBIO nº 15097-1
Nhecolândia (NHE)	Aquidauana/ Mato grosso do Sul	Pantanal	Sub-região Nhecolândia	Mediana	12 tatus-canastra (<i>Priodontes maximus</i>), 1 tatu-rabo-mole (<i>Cabassous unicinatus</i>), 4 tatu-peba (<i>Euphractus sexcintus</i>)	ICMBIO, SISBIO nº 27587-3
Santa Isabel do Rio Negro (SIRN)	Santa Isabel do Rio Negro/ Amazonas	Floresta Amazônica	Não informado	Baixa	18 morcegos de diferentes espécies ¹ , 3 roedores (2 <i>Dermacrina gnoma</i> , <i>Oecomys sp.</i>), 1 marsupial (<i>Metachirus sp.</i>)	ICMBIO, SISBIO nº 27923-4
Parque Estadual da Serra da Tiririca e a Reserva Ecológica Darcy Ribeiro (PEST/REDR)	Niterói, Maricá e São Gonçalo/ Rio de Janeiro	Mata Atlântica	Não informado	Mediana	13 micos leão da cara dourada (<i>Leontophitecus chrysomelas</i>)	ICMBIO, SISBIO nº 30939

¹*Lophostoma sp.*, *Molossus molossus*, *Glossophaga sorina*, *Desmodontinae* sp., *Mesophylla macconnelli*, *Tonatia saurophilla*, *Dermacrina gnoma*

Figura 1. Mapa do Brasil, em destaque vistas aéreas das regiões de A- Santa Isabel do Rio Negro (SIRN) - Amazônia; B- Parque Estadual da Serra da Tiririca e a Reserva Ecológica Darcy Ribeiro PEST/REDR) – Rio de Janeiro; C- Nhecolândia (NHE) – Mato grosso do Sul; D- Parque Estadual da Cantareira (PEC) – São Paulo



Fonte: Autora, 2013

3.2. Processamento das amostras

3.2.1. Isolamento e identificação de *E. coli*

Para a pesquisa de *E. coli* o swab retal foi semeado em ágar MacConkey (Difco™), sendo a caracterização das cepas realizada de acordo com as técnicas

rotineiras de identificação bioquímica (KONEMAN, 1997), incluindo os *kits* EPM, MILi, Citrato (ProbacTM). Após isolamento e identificação, as cepas foram congeladas a -70°C, em caldo BHI (DifcoTM) acrescido de partes iguais de glicerol a 80% para posterior caracterização genotípica e teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

3.2.2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

O *swab* para pesquisa de *Salmonella* spp. foi inoculado em água peptonada tamponada, incubada por 24h a 37°C. Uma alíquota de 1,0 mL foi transposta para 9,0 mL de caldo Tetratrationato (DifcoTM) e incubada por 24h a 42°C. Após essa ação, semeou-se em meio ágar XLT4 (OxoidTM) e incubou-se por 24h a 37°C (MICHAEL *et al.*, 2003). O processo foi finalizado com a identificação das colônias sugestivas de *Salmonella* spp. através das galerias de identificação API (BioMerieuxTM) e posterior sorotipagem em centro de referência (Instituto Adolfo Lutz). Após isolamento e identificação das cepas, as mesmas foram congeladas a -70°C, utilizando o mesmo procedimento descrito para *E. coli*, para posterior teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Foram testados 86 isolados de *E. coli* e quatro isolados de *Salmonella* spp. A susceptibilidade aos antimicrobianos seguiu a técnica de difusão em placa, segundo o preconizado por Kirby & Bauer, tendo como parâmetros a padronização internacional (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b). Foram consideradas multirresistentes, cepas resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARTZ *et al.*, 2010). Os antimicrobianos testados foram: β-lactâmicos - Amoxicilina 30 µg (AMO), Ampicilina 10 µg (AMP), Cefalexina 30 µg (CFE), Cefoxitina 30 µg (CFO), Ceftiofur 30 µg (CTF); Quinolona - Ciprofloxacina 5 µg (CIP), Enrofloxacina 5 µg (ENO); Anfenicol - Cloranfenicol 30 µg (CLO); Sulfonamida - Sulfametaxazol - trimetropim 25 µg (STX); Aminoglicosídeo - Estreptomicina 10 µg (EST), Gentamicina 10 µg (GEN); Tetraciclina 30 µg (TET) (CefarTM).

3.4. Pesquisa de fatores de virulência (FV) em isolados de *E. coli*

Para a investigação de marcadores de virulência nas cepas de *E. coli*, utilizou-se a técnica de “*Polimerase Chain Reaction*” (PCR). Foram pesquisados os genes *eae*, *stx1* e *stx2*, relacionados às cepas diarréogênicas (GANNON *et al.*, 1993; OLSVIK *et al.*, 1991) e os genes *sfa*, *papC*, *papEF*, *iucD*, *malX*, *cvaC*, *hly*, *fyuA*, *traT* e *cnf1* relacionados às cepas patogênicas extraintestinais (ExPEC) (JOHNSON; STELL, 2000; LE BOUGUENEC *et al.*, 1992; POLLARD *et al.*, 1990). A sequência dos iniciadores, a temperatura de anelamento e o tamanho dos amplificados estão descritos no quadro 2.

Para a pesquisa dos genes de virulência foram utilizadas reações de 50µL, contendo 5µL da amostra, 1,5 mM de MgCL₂ (exceto para o gene *stx1* e *stx2*, cuja concentração foi de 2,25 mM), 0,02 mM de cada dNTP para os genes *papEF*, *papC*, *malX*, *cnf1*, *fyuA* e *eae*; para os genes *sfa*, *cvaC*, *traT*, *hly*, *stx 1* e *stx 2* foi utilizado 0,04 mM de cada dNTP, 1µM de cada primer (com exceção do gene *hly*, cuja concentração é de 1,5 µM de cada primer), 1,5 unidade de *Taq* e água mili-Q qsp. Para a análise dos resultados do PCR, realizou-se a eletroforese dos amplificados em gel de agarose a 1%, em tampão TBE¹, colocando em ambas as extremidades do gel o marcador de peso molecular de 100 pb (NovergenTM). A corrida foi realizada a 100V por 1h, e, na sequência, o produto foi corado em brometo de etídio (0,5 ug/mL), visualizado em transiluminador UV e registrado em fotodocumentador (Kodak, *Gel Logic 212 Imaging System*TM).

¹ 10,8g de Tris Base (Bio Basic IncTM), 5,5g de ácido bórico (Carlo ErbaTM), 4mL de EDTA (0.5M pH 8,0) (Bio Basic IncTM) e 1mL de água mili-Q.

Quadro 2. Sequência, tamanhos dos amplificados e temperatura de anelamento dos iniciadores para a pesquisa de *E. coli* patogênicas

	Iniciador / Gene	Sequência	Tamanho molecular	Temperatura de
Diarreigonências	eae	5'ACGTTGCAGCATGGTAAC3' 5'GATCGGCAACAGTTCACCTG3'	815	58°C
	stx2	5'CTTCGGTATCCTATTCCC GG3' 5'GGATGCATCTCTGGTCATTG3'	478	55°C
	stx1	5'GAAGACTCCGTGGATTACG3' 5'AGCGATGCAGCTATTAATAA3'	130	55°C
ExPEC	<i>fyuA</i>	5'TGATTAACCCCGCGACGGAA3' 5'CGCAGTAGGCAAGATGTTGTA3'	787	63,5°C
	<i>cvaC</i>	5'CACACACAAACGGGAGCTGTT3' 5'CTTCCCGCAGCATA GTTCCAT3'	679	63,5°C
	<i>traT</i>	5'GGTGTGGTGCATGAGCACAG3' 5'CACGGTTCAGCCATCCCTGAG3'	290	63,5°C
	<i>sfa</i>	5'CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC3' 5'CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA3'	410	63,5°C
	<i>hly</i>	5'ACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT3' 5'ACCATATAAGCGGTATTCCCGTCA3'	1177	63,5°C
	<i>papC</i>	5'GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA3' 5'ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA3'	200	63,5°C
	<i>malX</i>	5'GGACATCCTGTTACAGCGCGA3' 5'TCGCCACCAATCACAGCCGAAC3'	930	63,5°C
	<i>cnf1</i>	5'AAGATGGAGTTCTATGCAGGAG3' 5'CATTAGAGTCCTGCCCTCATTATT3'	498	63,5°C
	<i>iucD</i>	5'TCCCGGATTGTCATATGCAGACCGT3' 5'AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG3'	602	63,5°C
	<i>papEF</i>	5'GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT3' 5'AGAGAGAGGCCATTCTTACGGACA3'	336	63,5°C

Fonte: Autora, 2013

3.5. Classificação dos Isolados de acordo com os grupos filogenéticos

A pesquisa dos genes selecionados para a análise filogenética foi realizada utilizando-se a técnica de PCR (CLERMONT, 2000), em reações de 50µL contendo: 5µL de DNA molde, 1,5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP, 20 pmol de cada um dos iniciadores (primer), 1,5uL de *Taq* DNA polimerase em 10X PCR *Buffer* e água mili-Q qsp. As reações foram submetidas ao ciclo de amplificação, cuja temperatura de anelamento foi de 56°C (quadro 3).

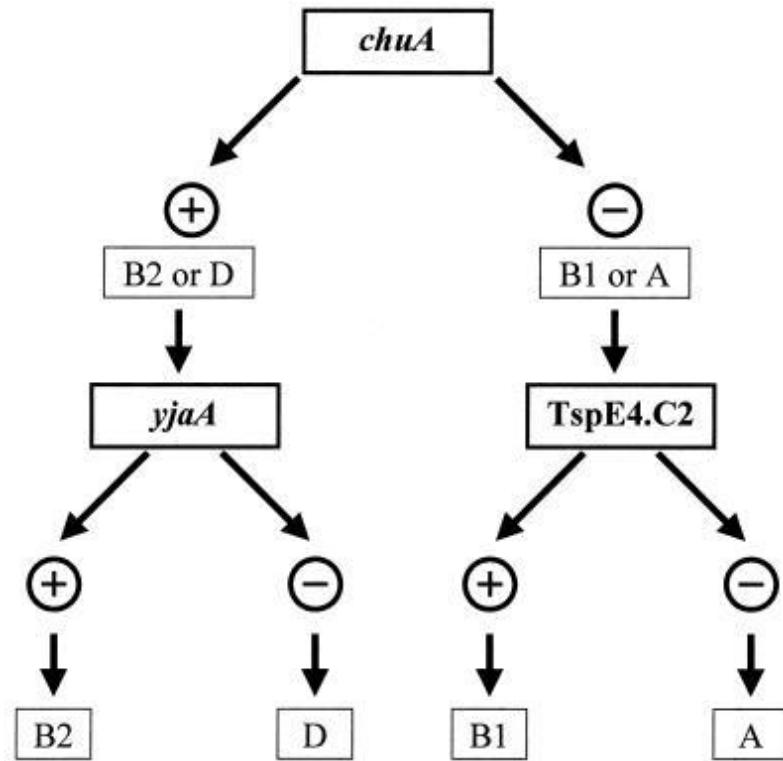
Quadro 3. Sequência de cada iniciador para a pesquisa de grupos filogenéticos

Iniciador	Sequência	Tamanho Molecular (pb)
<i>chuA</i>	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	279
<i>yjaA</i>	5'TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCTAAC-3'	211
TSPE4.C2	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152

Fonte: Autora, 2013

Para a análise dos resultados da PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE, colocando em ambas as extremidades do gel o marcador de peso molecular de 100 pb (*Novagen*TM). A corrida foi a 100V por 1 hora, sendo na sequência, o produto corado em brometo de etídeo (0,5 ug/mL) e visualizado em transiluminados UV e registrado em fotodocumentador da marca Kodak, modelo Gel Logic 212 Imaging System. Os resultados obtidos foram classificados de acordo com a árvore proposta por Clermont *et. al.*(2000), discriminada a seguir (Figura 2):

Figura 2. Árvore dicotômica para classificação filogenética de *E. coli*, através da utilização de resultados de PCR para os genes *chuA* e *yjaA* e para o fragmento TspE4.C2



Fonte: Clermont *et al.*, 2000

4. RESULTADOS

De 66 animais, foram isoladas 86 cepas de *E. coli*, distribuídas em diversas espécies de animais de todos os biomas estudados, e quatro cepas de *Salmonella enterica*, sendo duas de tatus canastra (*Priodontes maximus*) de NHE, e duas de animais de SIRN (tabela 1).

Das quatro cepas de *Salmonella enterica* estudadas, apenas um isolado, o sorotipo Carrau, proveniente de um tatu-canastra de NHE, apresentou multirresistência. Essa cepa foi resistente aos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), cloranfenicol, quinolonas e aminoglicosídeo. Os outros sorotipos foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (tabela 1).

Tabela 1. Origem, espécie animal, sorotipo e resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* obtidas de animais selvagens

Número Cepa	Origem	Espécie Animal	Sorotipo	Resistência*
14	NHE	Tatu canastra (<i>Priodontes maximus</i>)	Carrau	Amp, Amo, Cfe, Cfo, Cip, Clo, Eno, Est
17/3	NHE	Tatu canastra (<i>Priodontes maximus</i>)	Newport	Sensível
30	SIRN	Roedor (<i>Mesomys hispidus</i>)	60:r:e,n,z15	Sensível
36/2	SIRN	Morcego (<i>Molossus molossus</i>)	Belem	Sensível

*Amp – ampicilina, Amo – amoxicilina, Cfe – cefalexicina, Cfo – cefoxitina, Cip – ciprofloxacina, Clo – cloranfenicol, Eno – enrofloxacina, Est – estreptomicina

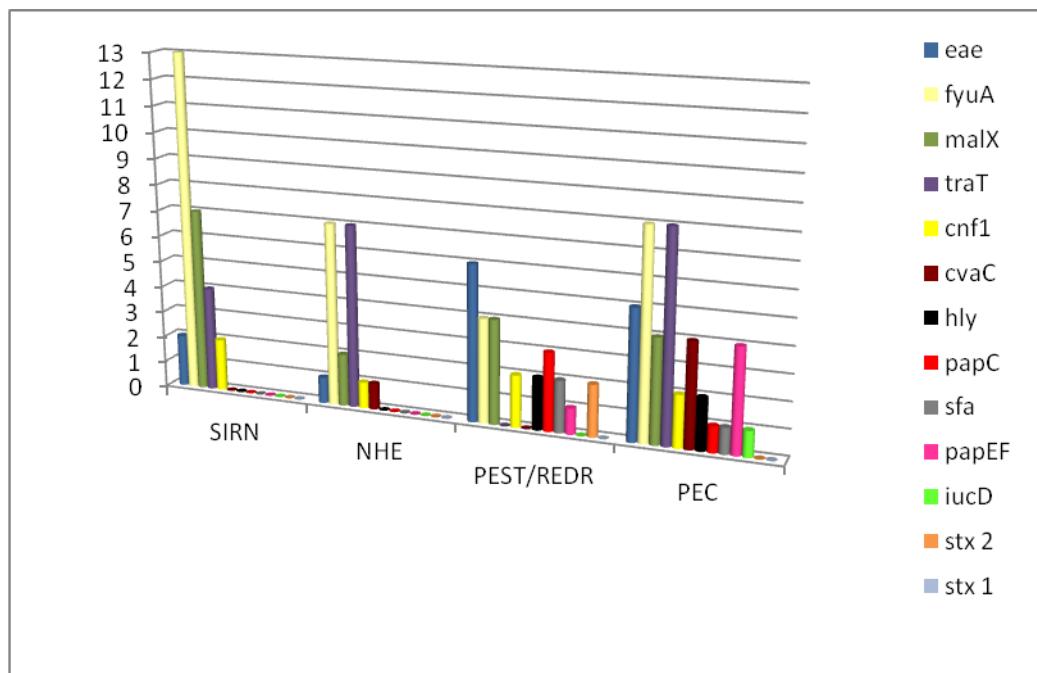
Fonte: Autora, 2013

Em relação à pesquisa de FV em isolados de *E. coli*, constatou-se que os genes *eae*, e *stx2* (marcadores de cepas diarreogênicas) estiveram presentes, respectivamente, em 14/86 (16,0%) e 2/86 (2,5%) das cepas estudas, entretanto, não houve concomitância desses. Das 14 cepas positivas para o gene *eae*, seis (7%) delas foram isoladas de mico-leão-da-cara-dourada, o que perfaz 35% (6/17) de positividade para essa espécie animal.

Para os FV relacionados às ExPEC, o gene que as cepas apresentaram maior frequência foi o *fyuA* com 33/86 (38,5%), seguido de *traT* 23/86 (26,0%) e *malX* 18/86 (21,0%). Os outros marcadores de ExPEC testados apresentaram um percentual mais baixo de positividade (*cnf1* – 7/86, 8,0%; *cvaC* – 5/86, 6,0%; *papEF* – 5/86, 6,0%; *papC* – 4/86, 4,5%; *hly* – 4/86, 4,5%; *sfa* – 3/86, 3,5%), em que o gene *iucD* apresentou baixa frequência entre as cepas, apenas 1,0% (1/86) (tabela 2 e figura 3).

Na pesquisa dos grupos filogenéticos, foi observada maior prevalência de cepas pertencentes ao grupo B1, com 42,0% (36/86), seguido do grupo A, com 25,5% (22/86) e percentuais próximos dos grupos B2 e D (18,5% - 16/86; 14,0% - 12/86, respectivamente). Analisando-se separadamente os grupos filogenéticos em relação ao local estudado, obteve-se no PEC o maior percentual de cepas do grupo B2 (33,5%) e, em NHE, maior percentual de cepas no grupo B1 (74,0%). Resultados semelhantes foram observados nas cepas obtidas dos animais de SIRN e PEST/REDR, em que o grupo A (35,0% e 41,0%, respectivamente) foi o mais prevalente (tabela 2 e figura 4).

Figura 3. Número absoluto de cepas positivas para os respectivos genes de virulência, isoladas dos animais selvagens, capturados em diferentes sítios geográficos (SIRN; NHE; PEST/REDR; PEC)



Fonte: Autora, 2013

Tabela 2. Presença de genes de virulência, grupo filogenético e sensibilidade aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas de animais selvagens

Origem	Cepa	Espécie animal	Genes de Virulência	Resistência aos Antimicrobianos*	Grupo Filogenético
PEC	1/1	Quati	<i>fyuA, papEF, hly, cvaC</i>		D
	1/2		<i>cvaC, malX</i>	Amp	D
	2/1		<i>papEF</i>	Amp	B1
	2/2		<i>eae</i>	Amp e Amo	A
	3		<i>eae, iucD, cnf1, traT</i>	Amp, Amo, Cip, Sxt, Est, Tet	A
	4		<i>eae, cvaC, traT</i>	Amp	B1
	5		<i>eae, traT</i>		B2
	6/1		<i>papC, papEF, sfa, fyuA, hly, cnf1, cvaC, traT</i>	Amp	B2
	6/2		<i>fyuA, malX, traT</i>	Amp, Amo, Cfo, Sxt, Tet	D
	7/1		<i>traT</i>	Amp	B1
	7/2		<i>fyuA, malX</i>	Amp	B2
	8		<i>fyuA, traT</i>	Amp, Cfo	B1
	9/1		<i>traT</i>	Amp, Amo, Cfe, Sxt, Est	D
	9/2		<i>eae, traT</i>		B2
	10	Gambá	<i>fyuA, malX, traT</i>	Amp, Stx	B2
	11		<i>fyuA, traT</i>	Amp, Sxt, Tet	A
	12		<i>fyuA, traT</i>	Amp, Amo	B2

(Continua)

Origem	Cepa	Espécie animal	Genes de Virulência	Resistência aos Antimicrobianos*	Grupo Filogenético
PEC	13	Cuica	<i>papEF</i>	Amp, Amo	A
NHE	15	Tatu-canastra		Amo, Cft	B1
	16/1		<i>cvaC</i>	Amp, Amo, Clo	B1
	16/2			Amp, Est	B1
	17/1		<i>eae</i>	Amp, Amo	B1
	17/2		<i>fyuA</i>	Amp, Amo, Cfe, Gen	D
	17/4			Amp, Amo	B1
	18/1			Amp, Amo	B1
	18/2		<i>fyuA, traT</i>	Amp, Amo, Cfe, Cfo	D
	19/1		<i>fyuA</i>	Amp, Amo	B1
	19/2		<i>fyuA, cnf1</i>	Amp, Amo	B1
	20/1		<i>traT</i>	Amp	B1
	20/2			Amp	A
	20/3				B1
	20/4		<i>traT, malX</i>	Amp, Amo, Cfe, Tet	A
	23		<i>traT</i>	Amp	B1
	24		<i>traT</i>		B1
	22/1			Amp, Amo, Cfe, Cfo	B1
	22/2		<i>fyuA</i>	Amp	B1
	22/3			Amp, Amo	B1

(Continua)

Origem	Cepa	Espécie animal	Genes de Virulência	Resistência aos Antimicrobianos*	Grupo Filogenético
NHE	27/1	Tatu-canastra		Amp	B1
	27/2			Amp, Amo, Cfe, Gen	A
	27/3		<i>traT</i>	Amp, Amo, Cfe, Cfo	B1
	27/4			Amp, Amo, Cfe, Cfo	B1
	27/5		<i>traT</i>		B1
	25	Tatu-de-rabo-mole		Amp	B1
	21/1	Tatu-peba		Amp	B1
	21/2			Amp, Amo	B1
	26/1		<i>fyuA</i>	Amp	B1
	26/2			Amp, Amo	B2
	26/3		<i>fyuA, malX</i>		B2
	28			Amp, Amo, Cfe, Cfo	A
SIRN	31	Roedor	<i>fyuA, traT</i>	Amp	A
	32	Rato-do-campo	<i>fyuA</i>	Amp, Amo	A
	33	Cuica		Tet	B1
	29	Morcego	<i>eae, fyuA, malX</i>		B2
	34			Amp, Amo	A
	35/1		<i>malX</i>	Amp, Amo	A
	36		<i>fyuA, cnf1</i>	Amp, Amo	B2

(Continua)

Origem	Cepa	Espécie animal	Genes de Virulência	Resistência aos Antimicrobianos*	Grupo Filogenético
SIRN	37/1	Morcego	<i>fyuA, malX</i>	Amp	B1
	37/2			Amp	D
	37/3		<i>fyuA, malX</i>	Amp	B2
	37/4		<i>fyuA, malX</i>		B1
	37/5		<i>fyuA</i>		B1
	38/1		<i>eae, traT, fyuA, malX</i>		A
	38/2		<i>traT</i>		B1
	38/3		<i>traT</i>		A
	39			Amp, Amo	A
	40		<i>fyuA, malX</i>	Amp, Amo	D
	41/1		<i>fyuA, cnf1</i>	Amp	D
	41/2		<i>fyuA</i>	Amp, Amo	D
	42		<i>fyuA</i>		B2
PEST/REDR	43	Mico leão da cara dourada	<i>fyuA, malX</i>		B1
	44		<i>eae, papC</i>	Amp	D
	45		<i>eae</i>	Amp, Amo	D
	46		<i>eae</i>	Amp	B1
	47/1				A
	47/2		<i>eae</i>	Amp, Amo	B1
	48		<i>eae, fyuA, malX</i>	Amp	B2

(Continua)

Origem	Cepa	Espécie animal	Genes de Virulência	Resistência aos Antimicrobianos*	Grupo Filogenético
PEST/REDR	49/1	Mico leão da cara dourada	<i>stx2</i>	Amp, Amo	A
	49/2		<i>eae</i>	Amp, Amo	B2
	50			Amp, Amo	B1
	51			Amp, Amo	A
	52				A
	53/1			Amp, Amo	A
	53/2		<i>fyuA, malX</i>		B2
	54		<i>fyuA, hly, sfa, papC, malX, cnf1</i>		A
	55/1		<i>stx2, papEF, fyuA, hly, sfa, papC, malX, cnf1</i>		B2
	55/2				A

*Amp – ampicilina, Amo – amoxicilina, Cip – ciprofloxacina, Est – estreptomicina, Cfe – cefalexicina, Cfo – cefoxitina, Cft - ceftiofur Tet – tetraciclina, Clo – cloranfenicol, Eno – enrofloxacina, Stx - Sulfametaxazol – trimetropim

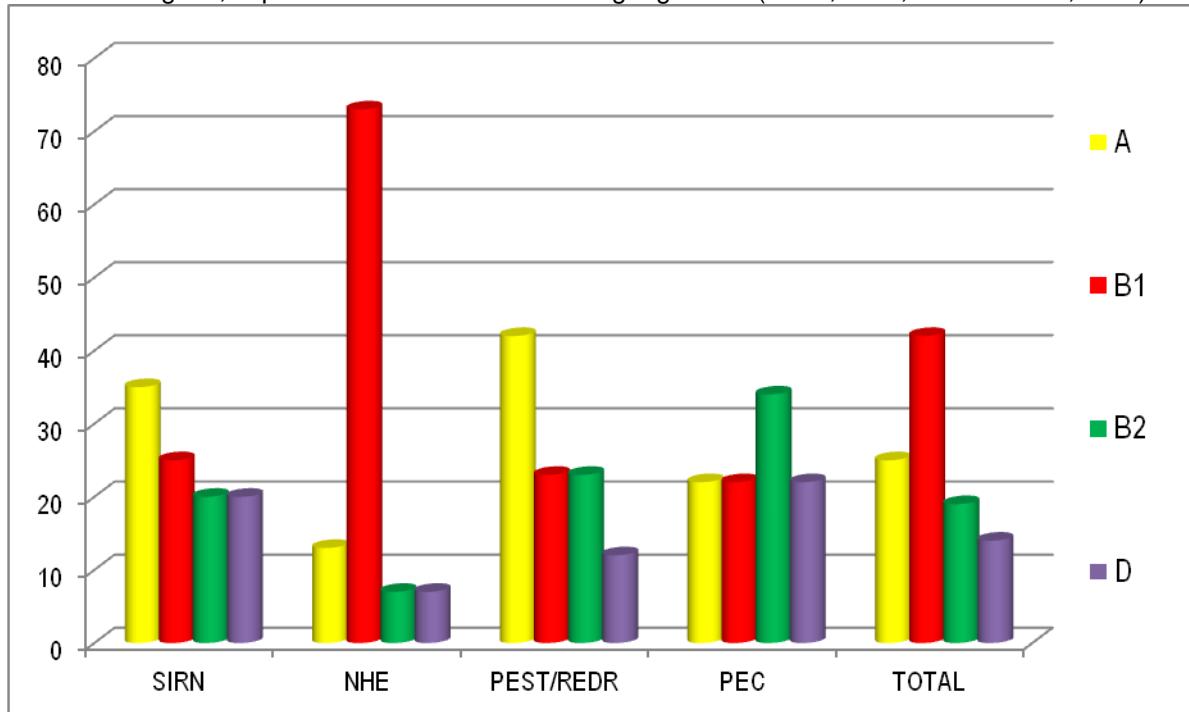
 Ausência de genes pesquisados e/ou resistência a antimicrobianos testados

Fonte: Autora, 2013

Comparando-se a presença de genes de virulência nas cepas obtidas nos quatro locais estudados, verifica-se que os isolados dos animais do PEC apresentaram com maior número de genes de virulência, sendo que todas as cepas apresentaram pelo menos um marcador, 72,0% (13/18) delas demonstraram dois ou mais genes testados e 33,0% (6/18) três ou mais genes. Nenhuma das cepas isoladas dos tatus de NHE apresentou mais que dois genes de virulência (13,0% - 4/31), o mesmo ocorrendo em relação aos animais da SIRN (35% - 7/20) com

exceção de duas amostras que apresentaram três ou mais genes de virulência (10%). Já nos isolados de animais do PEST/REDR observaram-se 29% (5/17) com dois genes ou mais e 18% (3/17) com três ou mais genes.

Figura 4. Percentual de cepas pertencentes aos respectivos grupos filogenéticos, isoladas dos animais selvagens, capturados em diferentes sítios geográficos (SIRN; NHE; PEST/REDR; PEC)



Fonte: Autora, 2013

Amostras oriundas de animais do PEC foram as cepas com maior percentual de genes de virulência e alta porcentagem de resistência (tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre os biomas estudados em relação à resistência e marcadores de virulência das cepas de *E. coli* obtidas dos animais selvagens

Local	Percentual de resistência ¹	Percentual de FV ²
NHE	31% ³ (87% ⁴)	17% ³ (48% ⁴)
PEC	17% ³ (83% ⁴)	21% ³ (100% ⁴)
SIRN	15% ³ (65% ⁴)	18% ³ (80% ⁴)
PEST/REDR	11% ³ (60% ⁴)	13% ³ (65% ⁴)

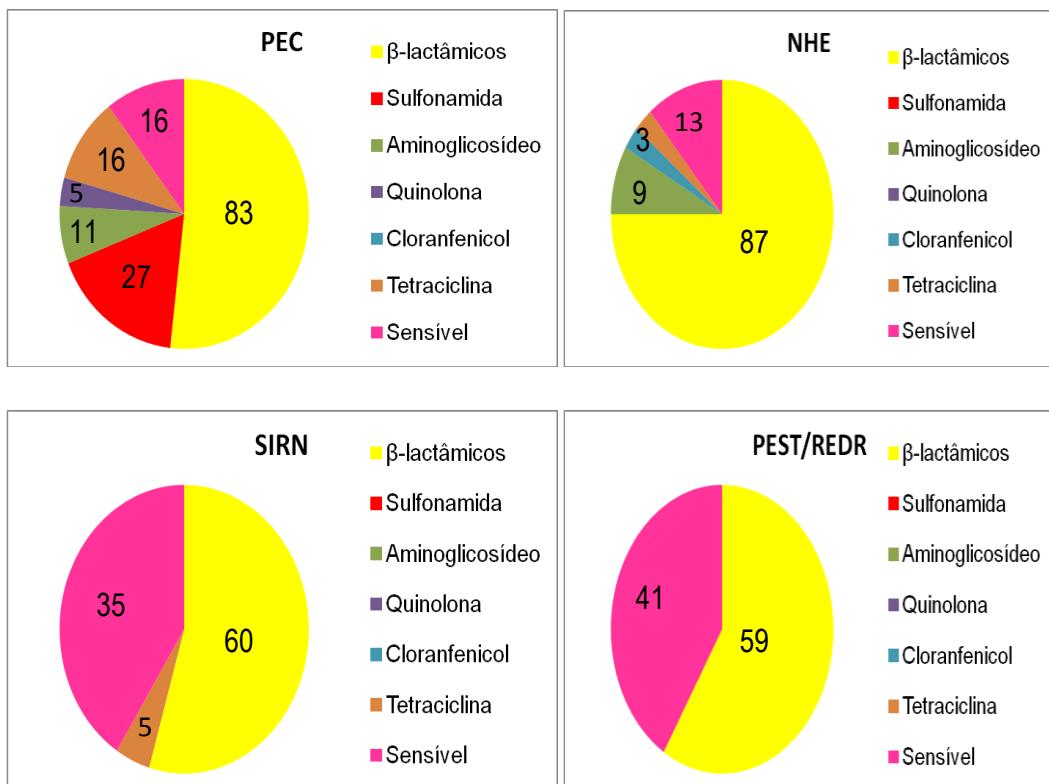
¹ Resistência a pelo menos um antibiótico testado ² Presença de pelo menos um marcador de virulência ³ Percentual em relação ao total das cepas estudadas ⁴ Percentual das cepas do local

Fonte: Autora, 2013

Os maiores percentuais de resistência foram verificados em relação aos β -lactâmicos (64/86 – 75,0%), onde 87,0% das cepas provenientes de animais de NHE mostraram-se resistentes a essa classe de antimicrobianos, 83% dos isolados relacionados ao PEC, 59,0% e 60,0% das cepas, respectivamente, do PEST/REDR e de SIRN. Ocorreu percentual igual de resistência à sulfonamida, aminoglicosídeos, e tetraciclina (5/86 – 6,0%). Os menores índices de resistência apresentados pelas cepas de *E. coli* foram referentes a cloranfenicol e quinolonas com 1,0% (1/86) cada (figura 5).

Analizando separadamente as cepas de *E. coli*, segundo suas origens, observa-se que as cepas obtidas de animais do PEC, assim como os isolados de NHE apresentaram resistência a um maior número de princípios ativos, tendo demonstrado percentuais semelhantes de resistência aos β -lactâmicos (83,0% e 87,0%, respectivamente) (figura 5).

Figura 5. Percentual de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos, isoladas de animais selvagens dos quatro biomas estudados



Fonte: Autora, 2013

Multirresistência foi observada em 4,5% (4/86) dos isolados de *E. coli*, todos provenientes de animais da PEC. Todas as cepas multirresistentes também apresentaram marcadores de virulência (tabela 4).

Tabela 4. Multirresistência em cepas de *E. coli* isoladas de animais selvagens do PEC e sua relação com genes de virulência e grupo filogenético

Nº da Cepa	*Resistência	Genes de Virulência	Grupo Filogenético
3	Amp, Amo, Cip, Stx, Est, Tet	<i>eae, cnf1, traT</i>	A
6/2	Amp, Amo, Cfo, Stx, Tet	<i>fyuA, malX, traT</i>	D
9/1	Amp, Amo, Cfe, Stx, Est	<i>traT</i>	D
12	Amp, Stx, Tet	<i>fyuA, traT</i>	A

*Amp – ampicilina, Amo – amoxicilina, Cip – ciprofloxacina, Est – estreptomicina, Cfe – cefalexicina, Cfo – cefoxitina, Tet – tetraciclina, Clo – cloranfenicol, Eno – enrofloxacina, Stx - Sulfametaxazol – trimetropim

Fonte: Autora, 2013

5. DISCUSSÃO

A pesquisa de patógenos comuns ao homem e animais, e o papel exercido pelo meio ambiente neste contexto é uma nova e relevante área de estudo denominada Medicina da Conservação, em que os animais selvagens podem representar importantes sentinelas dessa intersecção (WEINHOLD, 2003; RABINOWITZ *et al.*, 2009).

A *Salmonella* é uma bactéria considerada importante agente de doença zoonótica, onde alguns sorotipos descritos como agentes de infecção humana também foram isolados de animais selvagens. Esse fato sugere que esses animais podem ser considerados sentinelas da contaminação ambiental ou ainda reservatórios para outras espécies (SCHRÖTER *et al.*, 2004; SHENDER *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; UHART *et al.*, 2011; POTTER *et al.*, 2011).

Neste estudo, *Salmonella enterica* foi isolada de quatro animais (6,5%) dos 60 pesquisados, sendo dois (2/17) deles provenientes de NHE (Pantanal) e dois (2/22) de SIRN (Amazônia). As cepas isoladas de tatus de NHE foram sorotipadas como Newport e Carrau.

O sorotipo Newport tem o bovino como um dos reservatórios (TOTH *et al.*, 2011), tendo sido isolada também de ostras (BRANDS *et al.*, 2005), baleia (COLEGROVE *et al.*, 2010), leão-marinho (FENWICK *et al.*, 2004) e guaxinim (JARDINE *et al.*, 2011). No Brasil, há relato de isolamento desse sorotipo na água fornecida para animais de fazenda (SOUZA *et al.*, 1992), em crianças e adultos com problemas entéricos em Pernambuco (LEAL *et al.*, 1987), e em carcaças de equídeos abatidos (HOFER *et al.*, 2000). Essa cepa foi sensível a todos os antimicrobianos testados; dados semelhantes foram descritos por Colegrove (2010) e Jardine (2011), porém esse resultado foi diferente do observado por Toth (2011), cujos isolados apresentaram multirresistência. Tatus e gado bovino interagem em NHE, por compartilharem o mesmo ambiente, o que dá suporte a hipótese de contaminação ambiental e, por consequência, a infecção do tatu.

Salmonella Carrau foi primeiramente isolada de suíno, e recuperada também de crianças e adultos com diarreia (HORMAECHE *et al.*, 1944). No Brasil, esse sorotipo já foi isolado de equídeos (HOFER *et al.*, 2000) e correspondeu a 20% dos isolados de teiús nascidos em cativeiro (MACIEL *et al.*, 2010). Diferentemente do outro isolado de tatu desta pesquisa, esse apresentou multirresistência, o que também foi observado em outro estudo em que 100% das cepas de *Salmonella* Carrau foram resistentes a pelo menos um antibacteriano (MACIEL *et al.*, 2010). Informações não publicadas dão conta que teiús são frequentemente vistos ocupando as tocas utilizadas pelos animais capturados na presente investigação (KLUYBER, comunicação pessoal). O fato de *Salmonella* spp. perdurar no ambiente por longos períodos (OROZCO *et al.*, 2008), poderia explicar o isolamento de sorotipo relacionado a esses répteis em tatu, embora o papel do patógeno para esses animais ainda necessite ser esclarecido.

As outras duas cepas de *Salmonella* foram obtidas de animais selvagens de SIRN. Uma das cepas, isolada de roedor, foi caracterizada como subespécie *diarizonae* sorotipo 60:r:e,n,z15. Não existem dados na literatura sobre esse sorotipo, entretanto, a subespécie *diarizonae* é relacionada na literatura aos répteis, que são considerados reservatórios naturais (SCHRÖTER *et al.*, 2004; BAUWENS *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2011), além de ter sido isolada de rebanhos de ovinos (ALVSEIKE *et al.*, 2004). Essa subespécie foi ainda relacionada à salmonelose humana (HERVÁS *et al.*, 2012), sendo os répteis as principais fontes de infecção nesses casos. Esse isolado apresentou sensibilidade a todos os antibacterianos testados, o que também foi observado em outros estudos (SCHRÖTER *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2011).

A outra cepa foi sorotipada como Belem e foi isolada de morcego. Não há relatos na literatura de isolamento desse sorotipo em animais, porém já foi obtido de ambientes aquáticos na Amazônia (LOUREIRO, 2007). Segundo Loureiro (2007), nessa região, a água é importante veículo de disseminação de *Salmonella*, principalmente pelas precárias condições de saneamento básico local, o que possibilita a disseminação de diferentes sorotipos para o ambiente, população humana e animais. Essa cepa de *Salmonella* não apresentou resistência aos

antimicrobianos testados, à semelhança do descrito por Loureiro (2007) que refere baixa resistência nas cepas desse sorotipo, isoladas de ecossistemas aquáticos de diferentes localidades na Amazônia.

Estudos têm demonstrado que animais podem servir como fonte de infecção de *E. coli* para o homem (SÁNCHEZ *et al.*, 2010; BÈLANGER *et al.*, 2011; OBWEGESER *et al.*, 2012). As EHEC, cujo protótipo é o sorotipo O157:H7, merecem especial destaque, pois ocasionam doença grave no homem (KAPER *et al.*, 2004). Embora os bovinos sejam considerados os principais reservatórios naturais deste patógeno, animais selvagens têm sido referidos como potenciais reservatórios (SÁNCHEZ *et al.*, 2010; FREIDL *et a.*, 2011).

No presente estudo, apenas duas cepas isoladas de primatas sadios apresentaram positividade ao gene *stx2* (2,5%), sendo negativas para o gene *eae*, dessa maneira, descarta-se a possibilidade dessas cepas poderem ocasionar SHU. Não há relatos na literatura sobre a pesquisa de STEC em primatas não humanos, nem a descrição de doença nesses animais.

As EPEC têm sido isoladas de animais de companhia, ruminantes e aves (ISHII *et al.*, 2007), tendo os primatas não humanos como reservatórios de sorotipos capazes de causar doença no homem e em outros primatas (CARVALHO *et al.*, 2007). Na pesquisa em discussão, foi observada positividade para o gene *eae* em 16% das 86 cepas estudadas. Ainda que não tenha sido feita a caracterização completa dessas cepas, o fato relevante é que esse marcador esteve presente majoritariamente nos isolados dos primatas do PEST/REDR (6/17- 35%) e nos animais do PEC (5/18- 28%). No primeiro caso, os resultados estão de acordo com estudos que demonstraram que primatas não humanos, podem ser reservatórios de cepas com esse marcador (MANSFIELD *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003). Em contrapartida, para os quatis não existem dados na literatura, possibilitando a especulação de que a presença de cepas que albergam o gene *eae* nesses animais possa relacionar-se à forte ação antrópica local.

Com relação às infecções extraintestinais, ExPEC tem sido associada à infecções urinárias (ITU), meningites, pneumonias e septicemias, além disso, cepas

isoladas de animais com septicemia apresentaram FV semelhantes às ExPEC isoladas de infecções humanas (SMITH *et al.*, 2007) o que dá suporte à hipótese de transferência de patógenos entre animais e humanos, inclusive tendo o ambiente participação na veiculação dessas cepas (MASTERS *et al.*, 2011; BÉLANGER *et al.*, 2011).

Os genes de virulência com maior percentual de positividade foram o *fyuA* (38,5%), marcador de sideróforo; *traT* (26,0%), gene que está relacionado à sobrevivência no soro e *malX* (21,0%), marcador da ilha de patogenicidade (PAI_{CFT073}) da cepa protótipo de urosepsse. Genes codificadores de adesinas estiveram presentes em baixo número de isolados (*sfa*, 3,5%; *papEF*, 6,0% e *papC*, 4,5%), assim como os ligados a toxinas (*cnf1*, 8,0% e *hly*, 4,5%).

A presença de *fyuA* tem sido relacionada a ITU em cães e humanos (SMITH *et al.*, 2007). Esse marcador foi observado em maior percentual em isolados de animais de SIRN (65,0%), seguido de PEC e PEST/REDR (44,5%, 29,5%, respectivamente) e, em menor frequência, em isolados obtidos de animais de NHE (22,5%). O gene *malX* está relacionado a cepas com maior potencial de virulência (SMITH *et al.*, 2007) e esteve presente em porcentagens próximas nas cepas provenientes dos animais do PEC e PEST/REDR (22,0% e 29,5%), em porcentagem superior nas cepas de SIRN (35,0%) e em apenas 6,5% dos isolados de NHE. O gene *traT* é vinculado às cepas que ocasionam doença grave no homem e animais (ANANIAS; YANO, 2008; CARVALHO *et al.*, 2012), além disso, é também correlacionado com plasmídeos de resistência a antibióticos (KANUKOLLU *et al.*, 1985) dado que dá suporte aos resultados obtidos neste estudo, em que todas as cepas multirresistentes apresentaram também o gene *traT*.

Tanto genes relacionados às adesinas, como ao plasmídeo ColV (marcador *cvaC*) estiveram presentes em baixos percentuais nas cepas estudadas. As fímbrias ou adesinas são essenciais no processo de infecção, pois possibilitam a colonização das células do hospedeiro (LE BOUGUENEC *et al.*, 1992), a ausência de genes que codificam as adesinas S (*sfa*) ou fímbrias do tipo P (*papC* e *papEF*), entretanto, não desqualifica o potencial dessas cepas de ocasionarem infecção, uma vez que

poderia ocorrer a presença de outras adesinas não estudadas (VERDIER *et al.*, 2012).

Plasmídeos podem transferir genes de virulência e resistência a antimicrobianos, possibilitando a adaptação da bactéria em diferentes ambientes (CALL *et al.*, 2006; SMILLIE *et al.*, 2010). O plasmídeo ColV contribui na virulência da cepa, além de dispersar resistência a antibacterianos (WATERS; CROSA, 1991). A porcentagem de positividade ao marcador *cvaC* não foi alta (6,0%), porém a maioria das cepas que possuía esse gene apresentou também outros FV, além de resistência a algum antibacteriano.

A ilha de patogenicidade é caracterizada como um bloco de genes relacionados à virulência no cromossomo da bactéria (DIARD *et al.*, 2010). A PAI_{ICFT073} possui maior frequência em isolados de amostras clínicas de UTI do que em cepas de bacteriúria ou fecais. Trabalhos sugerem que isolados com maior potencial de virulência possuem maior prevalência de marcadores de ilha de patogenicidade (SMITH *et al.*, 2007), dado observado neste estudo, pois as cepas que possuíam a PAI_{ICFT073} eram positivas também a pelo menos mais um FV, tornando o isolado potencialmente mais patogênico.

Comparando-se os diferentes biomas amostrados verifica-se que 51,5% das cepas isoladas de indivíduos de NHE e 35,0% do PEST/REDR, não apresentaram nenhum dos genes pesquisados, sendo 20,0% a proporção verificada em SIRN. Uma possível explicação para esses resultados, nas duas primeiras áreas naturais, pode relacionar-se à média ação antrópica local. Entretanto, a ausência de marcadores de virulência em apenas 20% das cepas de SIRN, local com baixa atividade humana, pode relacionar-se aos aspectos acima discutidos que imputam à água e ao baixo índice de saneamento na Amazônia, a veiculação de patógenos potenciais (LOUREIRO, 2007; MÁSTERS *et al.*, 2011; NEGREANU *et al.*, 2012).

Diferentemente, todas as cepas de animais do PEC apresentaram pelo menos um dos genes estudados. Como a ação antrópica está relacionada à disseminação de cepas de *E. coli* (GUENTHER *et al.*, 2010), os resultados

observados no PEC são plausíveis, uma vez que esse é o local com a maior interação entre a vida selvagem e o homem dos locais estudados.

Considerando-se os grupos filogenéticos, os isolados deste estudo pertenciam em maior número ao grupo B1 (42,0%), porém 53,0% desses apresentaram pelo menos um FV relacionado a ExPEC. Esses resultados merecem maiores estudos, pois apesar das cepas patogênicas serem evolutivamente ligadas principalmente aos grupos B2 e D, poucos são os estudos que envolvam grande número de cepas de animais selvagens (JOHNSON ; STELL, 200; ISHII et al., 2007).

Um dado importante, relacionado aos grupos filogenéticos, é que 55% (10/18) dos isolados dos animais do PEC foram classificados nos grupos B2 (33%) e D (22%). As cepas que apresentaram multirresistência, todas do PEC, pertenciam aos grupos A e D, grupos que, normalmente, albergam cepas comensais e patogênicas intestinais, respectivamente. Além disso, esses isolados apresentaram alguns marcadores de virulência de ExPEC. Esses dados em conjunto reforçam a ideia de que a ação antrópica no local favorece a disseminação de cepas com potencial patogênico e/ou resistentes para o ambiente (JOHNSON; STELL, 2000).

Além da genotipagem da *E. coli* se prestar como ferramenta de avaliação da contaminação ambiental, a pesquisa de resistência aos antibacterianos também pode ser utilizada para esse fim (WANG et al., 2010; GUENTHER et al., 2010).

A resistência a antimicrobianos ocorre de maneira espontânea nos nichos ambientais, pois é importante na competição e seleção natural de bactérias (BHULLAR et al., 2012), porém houve aumento de resistência pela introdução de antibacterianos para o tratamento de infecções bacterianas (ALLEN et al., 2010).

Nas cepas obtidas dos animais selvagens estudados, o maior percentual de resistência foi referente aos β -lactâmicos, classe que é amplamente utilizada no tratamento de doenças tanto de humanos como de animais de companhia e produção (GUENTHER et al., 2010). A resistência a essa classe também já foi observada em cepas de *E. coli* isoladas de animais selvagens como lobo

(GONÇALVES *et al.*, 2012), lontras (BROWNSTEIN *et al.*, 2011), primatas (OGAWA *et al.*, 2011) e aves (BLANCO *et al.*, 2009).

Discute-se que a disseminação de resistência a essas drogas se deve ao seu uso indiscriminado como promotores de crescimento e prevenção de doenças em animais de criação (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002), além da sua utilização no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares humanas (GUENTHER *et al.*, 2011). A eliminação do princípio ativo, praticamente intacto no ambiente (NEGREANU *et al.*, 2012), e o tratamento não efetivo do esgoto (SAYAH *et al.*, 2005) pode levar à contaminação ambiental e disseminação da resistência às cepas do ambiente.

Os isolados, oriundos dos animais do PEC apresentaram alto percentual de resistência, inclusive multirresistência. Os animais estudados nesse local (Gambá, Quati e Cuica) possuem hábitos terrestres (MALTA, 2007; TEIXEIRA, 2007) e costumam remexer no lixo deixado no parque, fato observado frequentemente por visitantes.

Cepas isoladas de tatus de NHE, no entanto, foram as que apresentaram maiores percentuais de resistência (87%). Esses resultados podem advir dos hábitos desses animais que apresentam íntima relação com a terra e, por sua vez, sofre o impacto da criação extensiva de gado bovino (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

Percentuais mais baixos, porém significativos de resistência, foram verificados nos isolados do PEST/REDR e SIRN, o primeiro considerado de médio e o segundo de baixo impacto antrópico. Na PEST/REDR, pode ter contribuído para tal resultado o fato dos micos-leões-da-cara-dourada apresentarem hábitos arborícolas (VERONA; PISSINATTI, 2007), o que restringe a sua interação com os humanos quando comparado ao PEC. Entretanto em SIRN, o encontro de 60% das cepas resistentes aos beta-lactâmicos, local onde a interação de animais selvagens e homens é baixa, poderia ser imputado aos animais amostrados, a maioria morcegos e, portanto, capazes de interagir com diferentes ambientes. Ainda, as características geográficas e de saneamento da região poderiam contribuir com esses resultados,

como já discutido anteriormente (LOUREIRO, 2007; MÁSTERS *et al.*, 2011; NEGREANU *et al.*, 2012).

Analizando os resultados obtidos dos diferentes animais e biomas, constata-se que a ação humana parece intensificar a contaminação ambiental por cepas com potencial patogênico e/ou resistentes a antimicrobianos. Essa constatação pode ser sustentada pelos resultados obtidos com as cepas de animais do PEC, que apresentaram maior potencial patogênico e alto percentual de resistência. Embora as cepas obtidas de animais de NHE apresentem um percentual maior de resistência, os isolados de PEC possuíam percentual elevado de resistência, inclusive multirresistência, e maior prevalência relacionada aos FV comparado aos outros locais estudados.

Os hábitos diferenciados das espécies de animais selvagens podem contribuir para um maior contato com cepas potencialmente patogênicas e/ou resistentes, possibilitando a condição de portadores para esses indivíduos que, por sua vez, auxiliam na perpetuação e disseminação das cepas no ambiente. A caracterização de patógenos potenciais para a fauna selvagem é de grande importância, principalmente quando se considera que animais como tatus-canastra e mico-leão-da-cara-dourada estão ameaçados de extinção.

6. REFERÊNCIAS

- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 251-259, 2010.
- ALVSEIKE, O.; VARDUND, T.; LINDSTEDT, B.; HEIR, E.; ERIKSSON, E.; KAPPERUD, G. Molecular epidemiology and population genetics of *Salmonella* subspecies *diarizonae* in sheep in Norway and Sweden. **Epidemiol. Infect.**, v. 132, p. 253-261, 2004.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 877-883, 2008.
- BAUWENS, L.; VERCAMMEN, F.; BERTRAND, S.; COLLARD, J. M.; DE CEUSTER, S. Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 284-289, 2006.
- BÉLANGER, L.; GARENAUS, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 1-10, 2011.
- BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E. D.; JOHNSTON, M. D.; BARTON, H. A.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, p. 1-11, 2012.
- BLANCO, G.; LEMUS, J. A.; GRANDE, J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. **Environ. Res.**, v. 109, p. 405-412, 2009.
- BRANDS, D. A.; BILLINGTON, S. J.; LEVINE, J. F.; JOENS, L. A. Genotypes and antibiotic resistance of *Salmonella* Newport isolates from U.S. market oysters. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 2, p. 111-114, 2005.
- BROWNSTEIN, D.; MILLER, M. A.; OATES, S. C.; BYRNE, B. A.; JANG, S.; MURRAY, M. L.; GILL, V. A.; JESSUP, A. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from sea otters (*Enhydra lutris*). **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 278-292, 2011.

CALL, D. R.; KANG, M. S.; DANIELS, J.; BESSER, T. E. Assessing genetic diversity in plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella* enteric using a mixed-plasmid microarray. **J. App. Microbiol.**, v. 100, p. 15-28, 2006.

CARRASCO, S. E.; BUREK, K. A.; BECKMEN, K. B.; OAKS, J. L.; DAVIS, M. A.; BAKER, K. N.; MAZET, J. A. Aerobic oral and rectal bacteria of free-ranging stellar sea lion pups and juveniles (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 807-820, 2011.

CARVALHO V.M., GYLES C.L., ZIEBELL K.;RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I.L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1225-34, 2003.

CARVALHO V. M. 2007. Colibacilose e salmonelose, p. 742 – 750. In: Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L. (ed.), **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo.

CARVALHO, V. M.; IRINO, K.; ONUMA, D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 237-241, 2007.

CARVALHO, V. M.; OSUGUI, L.; SETZER, A. P.; LOPEZ, R. P.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; IRINO, K.; CATÃO-DIAS, J. L. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from captive wild felids with bacteremia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 24, p. 1014-1016, 2012.

CARVALLO, F. R.;DEBROY, C.;BAEZA, E. Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 22, p. 136-40, 2010.

CHANDRA, B. K.; SINGHM G.; TANEJA, N.; PAHIL, S.; SINGHI, S.; SHARMA, M. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial aidrrhoea in India. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 830-836, 2012.

CLERMONT, Q.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2008a.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard – eighteenth international supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2008b.

COLEGROVE, K. M.; LEGER, J. A. S.; RAVERTY, S.; JANG, S.; BERMAN-KOWALEWSKI, M.; GAYDOS, J. K. *Salmonella* Newport omphaloarteritis in a stranded killer whale (*Orcinus orca*) neonate. **J. Wildl. Dis.**, v. 46, p. 1300-1304, 2010.

DELSOL, A. A.; HALFHIDE, D. E.; BAGNALL, M. C.; RANDALL, L. P.; ENNE, B. I.; WOODWARD, M. J.; ROE, J. M. Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 140, p. 249-253, 2010.

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

FENWICK, S. G.; DUIGNAN, P. J.; NICOL, C. M.; LEYLAND, M. J.; HUNTER, J. E. B. A Comparison of *Salmonella* serotypes isolated from New Zealand sea lions and feral pigs on the Auckland Islands by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Wildl. Dis.**, v. 40, p. 566–570, 2004.

FOTI, M.; RINALDO, D.; GUERCIO, A.; GIACOPELLO, C.; ALEO, A.; DE LEO, F.; FISICHELLA, V.; MAMMINA, C. Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica, Sicily (Italy). **Avian Pathol.**, v. 40, p. 405-409, 2011.

FRANCO, A.; HENDRIKSEN, R. S.; LORENZETII, S.; ONORATI, R.; GENTILE, G.; DELL'OMO, G.; AARESTRUP, F. M.; BATTISTI, A. Characterization of *Salmonella* occurring at high prevalence in a population of the land iguana *Conolophus subcristatus* in Galápagos Islands, Ecuador. **PLoS One**, v. 6, p. 231-247, 2011.

FREIDL, G.; STALDER, G.; KOSTIC, T.; SESSITSCH, A.; BEIGLBÖCK, C.; WALZER, C.; Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in Chamois (*Rupicapra rupicarpa*) an cattle in Austria. **J. Wild. Dis.**, v. 47, p. 704-708, 2011.

FRIGGENS, M. M.; BEIER, R. Anthropogenic disturbance and the risk of flea-borne disease transmission. **Oecologia**, v. 164, p. 809-820, 2010.

GANNON, V. P.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E. J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 1268-1274, 1993.

GONÇALVES, A.; IGREJAS, G.; RADHOUANI, H.; ESTEPA, V.; PACHECO, R.; MONTEIRO, R.; BRITO, F.; GUERRA, A.; PETRUCCI-FONSECA, F.; TORRES, C.; POETA, P. Iberian Wolf as a reservoir of extend-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* of the TEM, SHV, and CTX-M groups. **Microb. Drug. Resist.**, v. 18, p. 215-219, 2012.

GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; HEIDEMANN, K.; SCHLEGEL, M.; ULRICH, R. G.; EWERS, C.; WIELER, L. H. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. **Sci. Total Environ.**, v. 408, p. 3519-3522, 2010.

GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L. H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Front. Microbiol.**, v. 2, p. 1-13, 2011.

HERVÁS, J. A.; ROSELL, A.; HERVÁS, D.; RUBIO, R.; DUEÑAS, J. MENA, A. Reptile pets-associated *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* gastroenteritis in a neonate. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 31, p. 1102-1103, 2012.

HOELZER, K.; MORENO SWITT, A.I.; WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Vet. Res.**, v. 1, p. 42-76, 2011.

HOFER, E.; ZAMORA, M. R. N.; LOPES, A. E.; MOURA, A. M. C.; ARAÚJO, H. L.; LEITE, J. D. D.; LEITE, D. D. L.; SILVA FILHO, S. J. Sorovares de *Salmonella* em carne de eqüídeos abatidos no nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, p.80-84, 2000.

HORMAECHE, E.; PELUFFO, C. A.; PEREYRA, V. R. A new *Salmonella* type, *Salmonella* Carrau, with special reference to the 1,7... phases of the Kauffmann-White classification. **J. Bacteriol.**, v. 47, p. 323-326, 1944.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 5703-5710, 2007.

JARDINE, C.; REID-SMITH, R. J.; JANECKO, N.; ALLAN, M.; MCEWEN, S. A. *Salmonella* in raccoons (*Procyon lotor*) in southern ontario, Canada. **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 344-351, 2011.

JIJÓN, S.; WETZEL, B. S.; LEJEUNE, D. V. M. *Salmonella enterica* isolated from wildlife at two Ohio Rehabilitation Centers. **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 38, p. 409-413, 2007.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-272, 2000.

KANUKOLLU, S.; BIELER, S.; HULL, S.; HULL, R. Contribution of the traT gene to serum resistance among clinical isolates of enterobacteriaceae. **J. Med. Microbiol.**, v. 19, p. 61-67, 1985.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KONEMAN, E.; ALLEN, D.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed., **Philadelphia: Lippincott**, 1997.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, p. 996-1005, 2009.

LEAL, N. C.; TAVARES DE SÁ, A.; SOLARI, C. A.; SILVA, S. J.; HOFER, E. Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife-Pernambuco, durante o triênio 1978-1980. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 43-49, 1987.

LEE, K.; IWATA, T.; NAKADAI A, K. T.; HAYAMA, S.; TANIGUCHI, T.; HAYASHIDANI, H. Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Campylobacter* spp. in Feral Raccoons (*Procyon lotor*) and Masked Palm Civets (*Paguma larvata*) in Japan. **Zoonoses Public Health**, v. 58, p. 424-431, 2011.

LEJEUNE, J. T. & DAVIS, M. A. Outbreaks of zoonotic enteric disease associated with animal exhibits. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 224, p. 1440-1445, 2004.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LOUREIRO, E. C. B. Epidemiologia descritiva de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do estado do Pará. 2007. 163 f. **Tese** (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará. 2007.

MACIEL, B. M., ARGÔLO FILHO, R. C.; NOGUEIRA, S. S.; DIAS, J. C., REZENDE, R. P. High prevalence of *Salmonella* in tegu lizards (*Tupinambis merianae*), and susceptibility of the serotypes to antibiotics. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 26-32, 2010.

MALTA M. C. C. & Luppi M. M. 2007. Marsupialia – Didelphimorphia (Gambá, Cuica), p. 340 – 357. In: Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L. (ed.), **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo.

MANSFIELD, K. G.; KUEI-CHIN, L.; DONGLING, X. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* and ulcerative colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 803-807, 2001.

MÁSTERS, N.; WIEGAND, A.; AHMED, W.; KATOULI, M. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. **Water Res.**, v. 45, p. 6321-6333, 2011.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin. Inf. Dis.**, v. 34, p. 93-106, 2002.

MICHAEL, G. B.; SIMONETI, R.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 138-142, 2003.

MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; THOMSON-CARTER, F.; USERA, M .A.; BARTOLOMÉ, R.; PRATS, G.; BLANCO, J. Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4007-4015, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.142–201, 1998.

NDUNG'U, F. K., NDEGWA, M. W., DEMAAR, J. W. Patent urachus with subsequent joint infection in a free-living Grevy's zebra foal. **J. Wildl. Dis.**, v. 39, p. 244-245, 2003.

NEGREANU, Y.; PASTERNAK, Z.; JURKEVITCH, E.; CYTRUN, E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 4800-4808, 2012.

OBWEGESER, T.; STEPHAN, R.; HOFFER, E.; ZWEIFER, C. Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of huntres wild ruminants, **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 149-154, 2012.

OGAWA, K.; YAMAGUCHI, K.; SUZUKI, M.; TSUBOTA, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Genetic characteristics and microbial resistance of *Escherichia coli* from Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in rural Japan. **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 261-270, 2011.

OH, J. Y., KANG, M. S., HWANG, H. T. Epidemiological investigation of eae-positive *Escherichia coli* and *Escherichia alberti* strains isolated from healthy wild birds. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 747-752, 2011.

OLIVEIRA, M.; PEDROSO, N. M.; SALES-LUÍS, T. SANTOS-REIS, M.; TAVARES, L.; VILELA, C. L. Antimicrobial-Resistant *Salmonella* isolated from Eurasian Otters (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. **J. Wildl. Dis.**, v. 46, p. 1257-1261, 2010.

OLSVIK, O.; RIMSTAD, E.; HORNES, E.; STROCKBINE, N.; WASTESON, Y.; LUND, A.; WACHSMUTH, K. A nested PCR followed by magnetic separation of amplified fragments for detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes. **Mol. Cell. Probes.**, v. 5, p. 429-435, 1991.

ORÓS, J., CALABUIG, P., DÉNIZ, S. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. **Vet. Rec.**, v. 155, p. 169-174, 2004.

OROZCO, L. R.; ITURRIAGA, M. H.; TAMPLIN, M. L.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B.; ESCARTIN, E. F. Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. **J. Food Prot.**, v. 71, p. 676-683, 2008.

POLLARD, D. R.; JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZEE, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 540-545, 1990.

POTTER, A. S.; REID, S. A.; FENWICK, S. G. Prevalence of *Salmonella* in fecal samples of western grey kangaroos (*Macropus fuliginosus*). **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 880-887, 2011.

RABINOWITZ, P.; SCOTCH, M.; CONTI, L. Human and animal sentinels for shared health risks. **Vet. Ital.**, v. 45, p. 23-24, 2009.

RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M. A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. L.; DJORDJEVIC, S. P. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RUNKEL, N. S.; RODRIGUEZ, L. F.; MOODY, F. G.; LAROCCHIO, M. T.; BLASDEL T. *Salmonella* infection of the biliary and intestinal tract of wild opossums. **Lab. Anim. Sci.**, v. 41, p. 54-56, 1991.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; REY, J.; GARCÍA, A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; HERRERA-LÉON, S.; ECHEITA, A.; ALONSO, J. M. Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. **Vet. Microbiol.**, v. 142, p. 445-449, 2010.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M. M.; RINCÓN-RUIZ, P. A.; DUQUE, S.; GIRALDO, M. A.; RAMÍREZ-MONROY, D. M.; JARAMILLO, G.; CARDONA-CASTRO, N. *Salmonella* enterica in semi-aquatic turtles in Colombia. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 28, p. 361-364, 2011.

SAYAH, R. S.; KANEENE, J. B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic – and wild – animal fecal samples, human septage and surface water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 1394-1404, 2005.

SHENDER, L. A.; GLOCK, R. D.; SPRAKER, T. R. Salmonellosis in a free-ranging population of javelinas (*Pecari tajacu*) in south central Arizona. **J. Wildl. Dis.**, v. 45, p. 941-951, 2009.

SCHIERACK, P.; WALK, N.; EWERS, C.; WILKING, H.; STEINRÜCK, H.; FILTER, M.; WIELER, L. H. ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* a small piglet group. **Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 1742-1751, 2008.

SCHRÖTER, M.; ROGGENTIN, P.; HOFMANN, J.; SPEICHER, A.; LAUFS, R.; MACK, D. Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 613-615, 2004.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; HOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SCIMECA, J. M.; BRADY, A. G. Neonatal mortality in a captive breeding squirrel monkey colony associated with an invasive *Escherichia coli*. **Lab. Anim. Sci.**, v. 40, p. 546-547, 1990.

SIEMBIEDA, J. L.; KOCK, R. A.; MCCRACKEN, T. A.; NEWMAN, S. H. The role of wildlife in transboundary animal diseases. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 12, p. 95-111, 2011.

SMILLIE, C.; GARCILL'N-BARCIA, M. P.; FRANCIA, M. V.; ROCHA, E. P. C.; CRUZ, F. Mobility of plasmids. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, p. 434-452, 2010.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.4, p.134-163, 2007.

SOUZA, L. C.; LARIA, S. T.; PAIM, G. V. *Salmonella* and fecal coliforms in drinking water for animals. **Rev. Saude Publica**, v. 26, p. 321-327, 1992

TEIXEIRA R. H. F. & Ambrosio S. R. 2007. Carnivora – Procyonidae (Quati, Mão-pelada, Jupará), p. 571 – 583. In: Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L. (ed.), **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo.

TOMPKINS, D. M.; DUNN, A. M.; SMITH, M. J.; TELFER, S. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. **J. Anim. Ecol.**, v. 80, p. 19-38, 2011.

TOTH, J. D.; ACETO, H. W.; RANKIN, S. C.; DOU, Z. Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Newport in the dairy farm environment. **J. Dairy Sci.**, v. 94, p. 5238-5246, 2011.

UHART, M.; FERREYRA, H.; MATTIELLO, R.; CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R.; SCHETTINO, A.; PRADO, W. Isolation of *Salmonella* spp. From yacare caiman (*Caiman yacare*) and broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) from the argentine chaco. **J. Wildl. Dis.**, v. 47, p. 271-277, 2011.

VERDIER, K.; NYMAN, A.; GREKO, C.; BENGTSSON, B. Antimicrobial resistance and virulence factor in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. **Acta. Vet. Scand.**, v. 54, p. 1-10, 2012.

VERONA C. E. S. & PISSINATII A. 2007. Primates – Primatas do novo mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio), p. 358 – 377. In: Cubas Z. S., Silva J. C. R., Catão-Dias J. L. (ed.), **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo.

WANG, Y.; TANG, C.; YU, X.; XIA, M.; YUE, H. Distribution of *Escherichia coli* isolated from ducks. **Avian. Pathol.**, v. 39, p. 297-302, 2010.

WATERS, V. L. & CROSA, J. H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiol. Reviews**, v. 55, p. 437-450, 1991.

WEINHOLD, Conservation medicine: Combining the best of all worlds. [Editorial]. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 10, ago., 2003.