

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

SHEYLA SANT'ANNA LESSA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA BACTERIANA
QUE COLONIZA PORCOS SELVAGENS (*Sus scrofa*) DO PANTANAL SUL-
MATOGROSSENSE**

Campos dos Goytacazes

Setembro - 2010

SHEYLA SANT'ANNA LESSA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA BACTERIANA
QUE COLONIZA PORCOS SELVAGENS (*Sus scrofa*) DO PANTANAL SUL-
MATOGROSSENSE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração de Sanidade Animal.

Orientador: Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes

Setembro - 2010

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DA MICROBIOTA BACTERIANA
QUE COLONIZA PORCOS SELVAGENS (*Sus scrofa*) DO PANTANAL SUL-
MATOGROSSENSE**

SHEYLA SANT'ANNA LESSA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 30 de setembro de 2010.

Comissão Examinadora

Rodiney de Arruda Mauro (PhD, Ecologia Tropical) Embrapa/MS

Carlos Ramón Ruiz Miranda (PhD, Animal Behavior) UENF

João Carlos de Aquino Almeida (Dr, Ciências Biológicas) UENF

Prof. Olney Vieira da Motta (Dr, Biociências e Biotecnologia) UENF
(Orientador)

Ao meu pai, pela sua grande sabedoria e capacidade de dar conselhos,
A minha mãe pelo carinho e incentivo,
Aos meus irmãos por me servirem sempre como exemplo,
e pela paciência e compreensão infinitos.

Dedico!

Agradecimentos

Estou de pé batendo palmas. De todo o coração, dou uma salva de palmas com os mais sinceros agradecimentos a:

A ti Deus, que me adotou como filha e estás presente em todos os momentos, cuidando de cada detalhe. Tal ciência é que me faz celebrar a vida a cada manhã.

Minha linda família. Meus pais Lessa e Rose, meus irmãos Cristiane, Daniele e Victor e meu sobrinho Enzo. O amor, suporte e compreensão de vocês, mesmo que isto signifique muitos quilômetros de casa e ausência da convivência diária, são a fonte da minha força e sem eles eu jamais teria completado este ou qualquer outro trabalho. Amo muito vocês e quero que saibam o quanto são importantes na minha vida. Em especial a “mirmã” Dani que me aturou pacientemente durante esses anos, sempre com muita compreensão e sábios conselhos. Obrigada Dani, você foi minha muleta durante toda essa fase.

Minhas grandes amigas de faculdade, Juliana, Késsia, Karla e Luana. O dicionário define a palavra *amigo*, mas vocês a demonstraram em todas as situações.

Colegas de laboratório, Rita, Luciana, Paula, Luize, Cristiani, Luiz, Fernando, João, Sara e Fernandas. Vocês trouxeram um pouco de “insanidade” ao Laboratório de Sanidade Animal, resultando em “equilíbrio”. Sinto-me honrada em ter trabalhado com vocês.

A Paula Santoro, uma grande companheira de trabalho. Sem você não teria concluído nem metade do proposto. Obrigada por toda a ajuda, compreensão, dicas... você tem potencial!

Gina, Lourdes, Cláudia e Rita, suas dicas e ensinamentos foram valiosos.

“Tio” Olney, meu digníssimo orientador, por toda a dedicação a este trabalho, pelos sábios ensinamentos, apoio, incentivo, confiança e compreensão.

Ao Prof. Dr. Enrique Medina, e todo seu grupo de pesquisa, Zila, Maria, Antonio, Cinthia, Edson, Luciana, Laís, Thaís, Viviane, Raphael e Felipe. A colaboração nessa pesquisa foi de suma importância. Obrigada pela paciência, boa disposição e sábios ensinamentos.

A prof^a. Dra. Agnes Marie de Sá Figueiredo, Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, IMPPG, UFRJ; prof^a. Dra. Kátia Regina Silva Aranda, UNIFESP; prof.

Dr. Francisco Ernesto Moreno Bernal, UNB e ao Dr Ivano de Filippis, INCQS, Fiocruz-RJ, pela concessão das cepas-padrão.

A toda equipe do projeto Porco Monteiro. Foi um imenso prazer fazer parte dessa equipe e contribuir para ampliação de conhecimentos sobre esse animal.

A Fazenda Santa Emília e Fazenda Nhumirim e todos do local, pela boa receptividade e apoio prestado em campo.

Aos animais que participaram deste trabalho e tornaram possível sua concretização.

A Uenf, Uniderp, CNPq e Faperj pelo apoio financeiro.

A Faperj pela concessão de bolsa.

A todos os brasileiros pagadores de impostos, que tornam possível a concessão de bolsas de apoio à pesquisa.

Obrigada!

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

“O temor ao Senhor é o princípio da ciência”.

Salomão, rei de Israel, 950 a.C.

RESUMO

O conhecimento sobre a microbiota que coloniza os porcos selvagens (*Sus scrofa*) do Pantanal é limitado. Este estudo teve por objetivo caracterizar os microrganismos que colonizam o porco selvagem do Pantanal, estudar seu perfil de resistência a drogas e realizar análise molecular de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos. Foram coletados suabes das regiões auriculares, boca, nariz, reto e vagina ou prepúcio de 22 porcos selvagens das sub-regiões da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal do Mato Grosso do Sul. Através de testes bioquímicos foram caracterizadas 319 bactérias, destas 212 são Gram-negativas e 107 Gram-positivas. Entre as bactérias Gram-negativas foram identificadas 6 *Pseudomonas* spp., 2 *Aeromonas caviae*, 154 Enterobacteriaceas (1 *Rahnella aquatis*, 2 *Proteus* spp., 2 *Buttiauxella agrestis*, 3 *Hafnia alvei*, 3 *Pantoea* spp., 5 *E. coli*, 11 *Cedecea* spp., 87 *Serratia marcescens*, 33 *Enterobacter* spp. e 7 não identificadas) e 50 bastonetes oxidase-positivos não identificados. As bactérias Gram-positivas foram classificadas como 1 *Aerococcus viridans*, 4 *Kocuria* spp., 22 *Staphylococcus* spp., 59 *Enterococcus* spp. e 21 bastonetes não identificados. Não foi detectada a produção de enterotoxinas estafilocócicas pelo teste de Elisa. Susceptibilidade a drogas foi testada pela técnica de difusão em ágar frente a 17 antimicrobianos, onde *Enterococcus* mostrou alta resistência a oxacilina (98%), cefoxitina (95%) e clindamicina (80%). Os *Staphylococcus* apresentaram maior susceptibilidade aos antimicrobianos testados, e sua maior resistência foi a ampicilina (18%) e clindamicina (14%). Dois isolados de *Staphylococcus* (9%) foram resistentes a oxacilina. As enterobactérias mostraram maior resistência frente aos β -lactâmicos cefalotina, amoxicilina+ácido clavulânico e ampicilina, mas em geral foram bem susceptíveis aos antimicrobianos testados. Os genes de virulência *aea*, *espA* e *espB* não foram detectados nos isolados de *Escherichia coli* e o gene *vanB* não foi encontrado em isolados de *Enterococcus*, quando testados por PCR. As cepas isoladas de porcos selvagens do Pantanal não apresentaram patogenicidade, porém algumas espécies mostraram alta resistência a alguns antibióticos.

Palavras-chave: microbiota, PCR, susceptibilidade aos antimicrobianos, fatores de virulência, porcos selvagens, Pantanal.

ABSTRACT

The knowledge about the microbiota lives in wild pigs (*Sus scrofa*) of the Pantanal is limited. This study aimed to characterize the microorganisms that colonize feral pigs in the Pantanal, to study their drug resistance profile and perform molecular analyses of virulence factors and antimicrobials resistance. Swabs were collected from the ear, mouth, nose, rectum and vagina or prepuce of 22 wild pigs from the regions of Nhecolândia and Rio Negro in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. Biochemical tests characterized 319 bacteria, 212 of these were Gram-negative and 107 gram-positive. Among the Gram-negative bacteria were 6 *Pseudomonas* spp., 2 *Aeromonas caviae*, 154 enterobacteria (1 *Rahnella aquatis*, 2 *Proteus* spp., 2 *Buttiauxella agrestis*, 3 *Hafnia alvei*, 3 *Pantoea* spp., 5 *E. coli*, 11 *Cedeca* spp., 87 *Serratia marcescens*, 33 *Enterobacter* spp. and seven unidentified) and 50 unidentified oxidase-positive rods. The gram-positive were classified as 1 *Aerococcus viridans*, 4 *Kocuria* spp., 22 *Staphylococcus* spp., 59 *Enterococcus* spp. and 21 unidentified rods. The production of staphylococcal enterotoxins was not detected by Elisa test. Drug susceptibility was tested by agar diffusion technique against 17 antimicrobial agents, and *Enterococcus* showed high resistance to oxacillin (98%), cefoxitin (95%) and clindamycin (80%). *Staphylococcus* showed greater susceptibility to the antibiotics tested, and its highest resistance was to ampicillin (18%) and clindamycin (14%). Two strains of *Staphylococcus* (9%) were resistant to oxacillin. Enterobacteria showed greater resistance against β -lactam cephalothin, amoxicillin+clavulanic acid and ampicillin, but in general were very susceptible to the antimicrobials tested. Virulence genes *eae*, *espA* and *espB* were not detected in isolates of *E. coli* and the *vanB* gene was not found in isolates of *Enterococcus* when tested with PCR. The strains isolated from wild pigs in the Pantanal were not pathogenic, but some species showed high resistance to some antimicrobials.

Key-words: microbiota, PCR, antibiotic susceptibility, virulence factors, wild pigs, Pantanal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Paisagens características do Pantanal brasileiro.....	16
Figura 2: Mapa destacando as sub-regiões do Pantanal.	18
Figura 3: Porco selvagem do Pantanal brasileiro.	20
Figura 4: Distribuição das densidades de porco-monteiro (grupos/km ²) no Pantanal (setembro de 1991).....	22
Figura 5: Esquema de identificação de isolados bacterianos.....	36
Figura 6: Possíveis fontes de disseminação bacteriana no Pantanal.....	50
Figura 7: Esquema demonstrando as condições de amplificação pela técnica de PCR.	58
Figura 8: Esquema de interpretação do eletroferograma	60
Figura 9: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa do gene 16SrDNA em <i>E. coli</i> isolados de porcos selvagens do Pantanal.	61
Figura 10: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa dos genes eae (1), espA (2) e espB (3) em <i>E. coli</i> isolados de porcos selvagens do Pantanal	62
Figura 11: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa dos genes 16SrDNA (1) e <i>vanB</i> (2) em <i>Enterococcus</i> isolados de porcos selvagens do Pantanal. ..	63
Gráfico 1: Frequência de bactérias isoladas de porco selvagem (<i>Sus scrofa</i>) provenientes do Pantanal sulmatogrossense, no ano de 2008.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bactérias isoladas do porco silvestre (<i>Sus scrofa</i>) provenientes do Pantanal sulmatogrossense, no ano de 2008, sua frequência nas diferentes regiões corporais e número de animais colonizados.	41
Tabela 2: Bactérias isoladas de cada porco selvagem (<i>Sus scrofa</i>) estudado na sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense e suas respectivas regiões de isolamento.....	77
Tabela 3: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de 154 enterobactérias isoladas de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.....	46
Tabela 4: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de bastonetes Gram-negativos não Enterobacteriaceae isolados de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.....	47
Tabela 5: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de cocos Gram-positivos isolados de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.....	49
Tabela 6: Iniciadores para estudos moleculares com <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i>	56
Tabela 7: Protocolo para preparo do tampão de reação para PCR.	57

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	110
SUMÁRIO	121
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO LITERÁRIA	15
2.1 Área geográfica de estudo	15
2.1.1 Sub-região da Nhecolândia.....	18
2.1.2 Sub-região do Rio Negro.....	19
2.2 Porco monteiro	19
2.3 Aspectos sanitários do porco monteiro	23
2.3.1 Bactérias patogênicas.....	25
2.3.2 Resistência bacteriana.....	29
<i>CAPÍTULO I: Identificação e perfil de susceptibilidade a drogas da microbiota bacteriana que coloniza porco monteiro no Pantanal.</i>	32
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Coleta de Amostras	34
4.2 Processamento microbiológico	35
4.2.1 Isolamento microbiano.....	35
4.2.2 Identificação bacteriana.....	35
4.3 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos	37
4.4 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs)	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Microbiota	39
5.2 Produção de enterotoxinas estafilocócicas	44
5.3 Resistência aos antimicrobianos	45
6. CONCLUSÕES	52
<i>CAPÍTULO II: Análise molecular de fatores de virulência e resistência a antibióticos em isolados bacterianos de porco monteiro do Pantanal.</i>	53
3. OBJETIVOS	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Desenho dos iniciadores	55

4.2 Extração de DNA bacteriano	56
4.3 Quantificação de DNA extraído.....	57
4.4 Amplificação do DNA.....	57
4.5 Eletroforese capilar.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Amplificação de genes de virulência em <i>Escherichia coli</i>	61
5.2 Amplificação de genes de resistência em <i>Enterococcus</i>	63
6. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

O porco monteiro (*Sus scrofa*) é um animal muito abundante no Pantanal, sendo avistado em toda a sua extensão (MOURÃO et al., 2002). É o principal alvo de caça pelos moradores locais para obtenção de carne e banha. Sua carne é apreciada e constitui-se na principal fonte de proteína animal para os pantaneiros (LOURIVAL, 1993).

Dadas as características peculiares que possuem, como excelente rusticidade, boa capacidade proliferativa e sabor da carne, esforços vêm sendo desenvolvidos com o propósito de ampliar o conjunto de informações quanto à possibilidade de exploração sustentável da espécie, e pesquisas nas áreas de produção, reprodução, manejo, alimentação e sanidade do porco monteiro estão em andamento.

Poucas são as informações sobre o perfil sanitário desse animal. Estudos mostraram que o porco monteiro é hospedeiro de alguns parasitas que infectam o homem como o *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma evansi* (HERRERA et al., 2005), do vírus da Doença de Aujeszky (FREITAS et al., 2004; PAES, et al., 2009), *Brucella* spp. (PAES, et al., 2009) e de leptospiros (GIRIO et al., 2004; PAES, et al., 2009). Esses e outros microrganismos, que ainda não temos ciência de sua presença colonizando os porcos selvagens no Pantanal, podem ser transmitidos para a fauna nativa, animais domésticos e humanos.

Jay et al., (2007), apontam essa possibilidade de transmissão microbiana entre animais selvagens e humanos, quando sugerem que porcos selvagens e/ou bovinos carreando *E. coli* O157:H7 seriam os responsáveis pela contaminação de espinafres que levou a um surto na Califórnia que debilitou 205 pessoas e levou três a óbito.

Outro aspecto preocupante na interação de porcos selvagens com humanos e criações domésticas é a transferência de genes de resistências que pode ocorrer entre os microrganismos de suas microbiotas. Um estudo na província francesa mostrou a presença de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos colonizando porcos e fazendeiros. Os autores sugerem uma transferência desses microrganismos resistentes dos porcos ao homem, ou vice-versa (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005).

O ambiente no Pantanal é bem propício para a transmissão bacteriana. O porco monteiro compartilha o mesmo ambiente com a fauna nativa, gado e outros animais domésticos, e o hábito do porco de revolver a terra em busca de alimento e

rolar na lama facilita o contato com excrementos desses animais, possibilitando o intercâmbio de microrganismos e doenças. Somado a este contexto ecológico está o fato desta espécie ser o principal alvo de caça pela população local, colocando o homem e animais domésticos usados na caça em estreito contato durante a prática da caça tradicional (LOURIVAL, 1993), o que também é um fator para transferência microbiana (ROSENKRANZ et al., 2003), além da possível aquisição de microrganismos através da ingestão da carne do animal.

No entanto, pouco é conhecido sobre a microbiota de porcos selvagens do Pantanal, bem como a influência que esses animais, e, conseqüentemente a sua microbiota, sofre e exerce sobre criações domésticas, fauna nativa e humanos.

Diante desse cenário surge a questão: quais microrganismos o porco monteiro carrega, qual a patogenicidade destes e perfil de resistência a drogas? Com o conhecimento desta microbiota, informações relevantes sobre os possíveis riscos tanto para os humanos que consomem a carne ou subprodutos dos porcos selvagens do Pantanal, bem como conhecimentos para pesquisas sobre tais influências sobre os animais domésticos, selvagens e humanos poderão ser de grande utilidade local.

Sendo assim, este trabalho tem o objetivo de identificar parte da microbiota bacteriana que coloniza o porco selvagem do Pantanal e caracterizá-los quanto ao perfil de resistência a drogas antimicrobianas e produção de toxinas e analisar genes de patogenicidade e de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* isolados de porco selvagem.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Área geográfica de estudo

Considerado a maior planície inundável de água doce da Terra, o Pantanal (15°45' a 22°15'S e 54°45' a 58°O) está localizado no centro da América do Sul e abrange as terras do Brasil, Paraguai e Bolívia. O Pantanal brasileiro, que corresponde a 72% do Pantanal, possui aproximadamente 140.000Km² distribuídos entre o Estado do Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%), ambos incluídos na região centro-oeste do Brasil, na bacia do rio Paraguai (SILVA & ABDON, 1998).

A declividade do Pantanal é muito baixa, variando de 1 a 2 cm/Km no sentido norte-sul e de 6 a 12 cm/Km no sentido leste-oeste. Isso faz com que a velocidade das águas seja muito lenta e com isso, nos períodos de chuva, os rios sobem lentamente e as águas se espalham pela planície, causando inundação (MOURA, 2002). Podem ser definidas duas estações: a chuvosa, que ocorre geralmente de outubro a março, e o nível das águas pode subir mais de um metro e grande parte da região fica submersa; e a de seca, entre abril e setembro, onde somente persistem alguns rios, poços e lagoas perenes e os animais se concentram ao redor destes corpos d'água (EMBRAPA, 2009). Esse ciclo de água rege a vida no Pantanal, mudando o comportamento dos animais, dos rios, da flora e do homem pantaneiro.

A região apresenta uma grande diversidade de habitat, variando desde áreas florestadas até habitat totalmente aberto. Áreas abertas incluem lagoas de água doce (localmente denominadas baías), lagoas de águas salobras (salinas), campos inundáveis e não inundáveis, e cerrado aberto. As áreas fechadas incluem as cordilheiras, que são pequenas elevações de terreno que não sofrem alagamento, recobertas de cerrado denso, cerrado e matas semi-decíduas (ALLEM & VALLS, 1987) (figura 1).

As cordilheiras são importantes refúgios para muitas espécies de animais silvestres, especialmente nos períodos de enchente e/ou reprodução (SILVA *et al.*, 1999). É comum, na época de enchente, ocorrer a união de várias lagoas, que se ligam por vazantes (escoadouros naturais e intermitentes de água), formando um sistema coalescente. Durante a fase mais crítica da estação seca (agosto e

setembro), algumas delas secam ou diminuem consideravelmente de volume.

As salinas e baías são utilizadas como fonte de água e alimento para animais domésticos e como habitat temporário para algumas espécies de mamíferos nativos (ABDON et al., 1998). As baías ainda são utilizadas como fonte de água para consumo humano nas fazendas (BRUM & SOUZA, 1985).

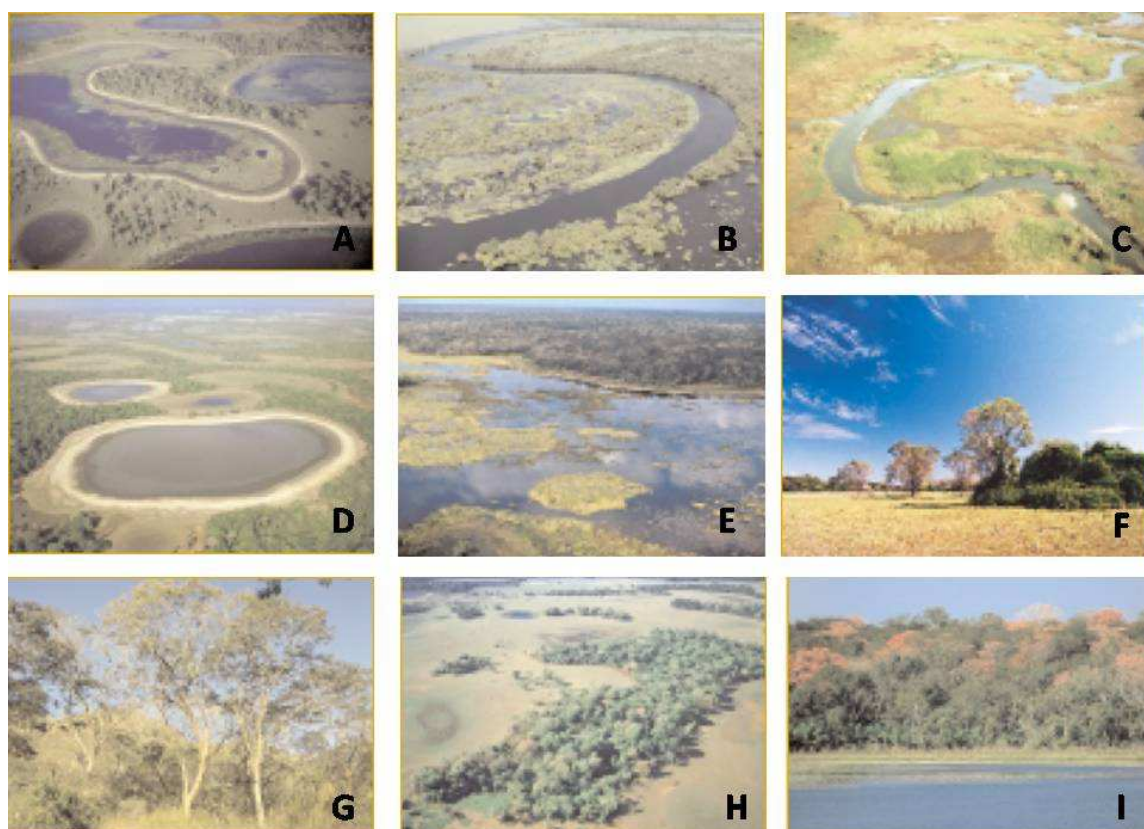


Figura 1: Paisagens características do Pantanal brasileiro.

A: BAÍAS, lagoas de água doce, de tamanho e forma variadas, quase sempre cobertas por vegetação aquática. **B:** VAZANTES, canais naturais de drenagem. **C:** CORIXOS, pequenos riachos, intermitentes ou não. **D:** SALINAS, lagoas de água salobra, sem vegetação aquática visível. **E:** CORDILHEIRAS, elevações de três a quatro metros de altura que a água nunca atinge, são cobertas por vegetação florestal. **F:** CERRADOS, uma vegetação savânica, formada por um estrato arbustivo com predominância de gramíneas e um estrato constituído por árvores e arbustos baixos, retorcidos, com casca espessa sobre um solo ácido, quimicamente pobre, rico em alumínio. **G:** CERRADÕES, semelhantes aos cerrados, porém mais densos e de porte florestal. **H:** CAPÕES, ilhas de vegetação arbórea cercadas por campos inundáveis. **I:** MATAS CILIARES, vegetação presente às margens dos rios.

FONTE: Projeto Tom do Pantanal/Caderno do professor 2: <http://www.tomdopantanal.org.br/biblioteca/livros.asp>

Dominado por uma mistura complexa de comunidades de plantas e animais de vários ecossistemas, o Pantanal abriga diversificada e abundante fauna e flora. Essa

riqueza está relacionada principalmente à disponibilidade de habitats diferentes ao longo do ano, em função dos ciclos de cheia e seca.

A flora adota um padrão diferente de acordo com o solo e a altitude. Nas regiões mais baixas, onde o solo é úmido, predominam as gramíneas formando campos limpos para pastagens. Nas regiões de altitude intermediária a vegetação é de cerrado, com árvores de porte médio entremeadas de arbustos e plantas rasteiras. Árvores maiores são encontradas nas regiões mais altas. (SILVA et al., 2000).

A fauna pantaneira é bastante rica e abriga aproximadamente 262 espécies de peixes, 100 espécies de mamíferos, 35 espécies de anfíbios, 160 espécies de répteis, 1.132 espécies de borboletas e 700 espécies de aves (MAURO et al., 2002; WWF, 2009), entre elas, aves migratórias que encontram no Pantanal características ambientais e condições ideais para uma pausa na sua rota (NUNES & TOMAS, 2008). São dignas de atenção especial a presença de populações numerosas de diversas espécies ameaçadas de extinção, como a arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), onça-pintada (*Panthera onca*), ararinha (*Pteronura brasiliensis*) e o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

A principal atividade econômica da região é a pecuária de corte, com uma população de bovinos estimada em 4,5 milhões, colocando o Pantanal como um importante centro agroindustrial da América Latina (MOURÃO et al., 2002), porém a fauna, flora, o turismo e a mineração também apresentam potencial para utilização. Dentre as espécies da fauna que apresentam ampla distribuição e reconhecido valor comercial destacam-se o jacaré (*Caiman crocodilus yacare*), a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e o porco monteiro (*Sus scrofa*) (COUTINHO et al., 1997). A agricultura também é praticada no Pantanal, embora tenha pouca expressão como atividade econômica. Na região do Planalto, a agricultura é praticada em larga escala com a utilização de grande quantidade de agrotóxicos que são carregados para os cursos de água, atingindo a planície do Pantanal. Uma vez na planície, os impactos ambientais dessa contaminação são agravados pela baixa velocidade de escoamento dos rios da região que prolonga o tempo de permanência dos poluentes e, conseqüentemente, favorece o efeito cumulativo (DA SILVA & AMARAL, 2007).

O Pantanal não é uniforme em sua extensão, e segundo Silva e Abdon (1998), é possível identificar 11 sub-regiões de acordo com sua inundação, relevo, solo e

vegetação. São elas Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda, Nabileque e Porto Murtinho (figura 2).

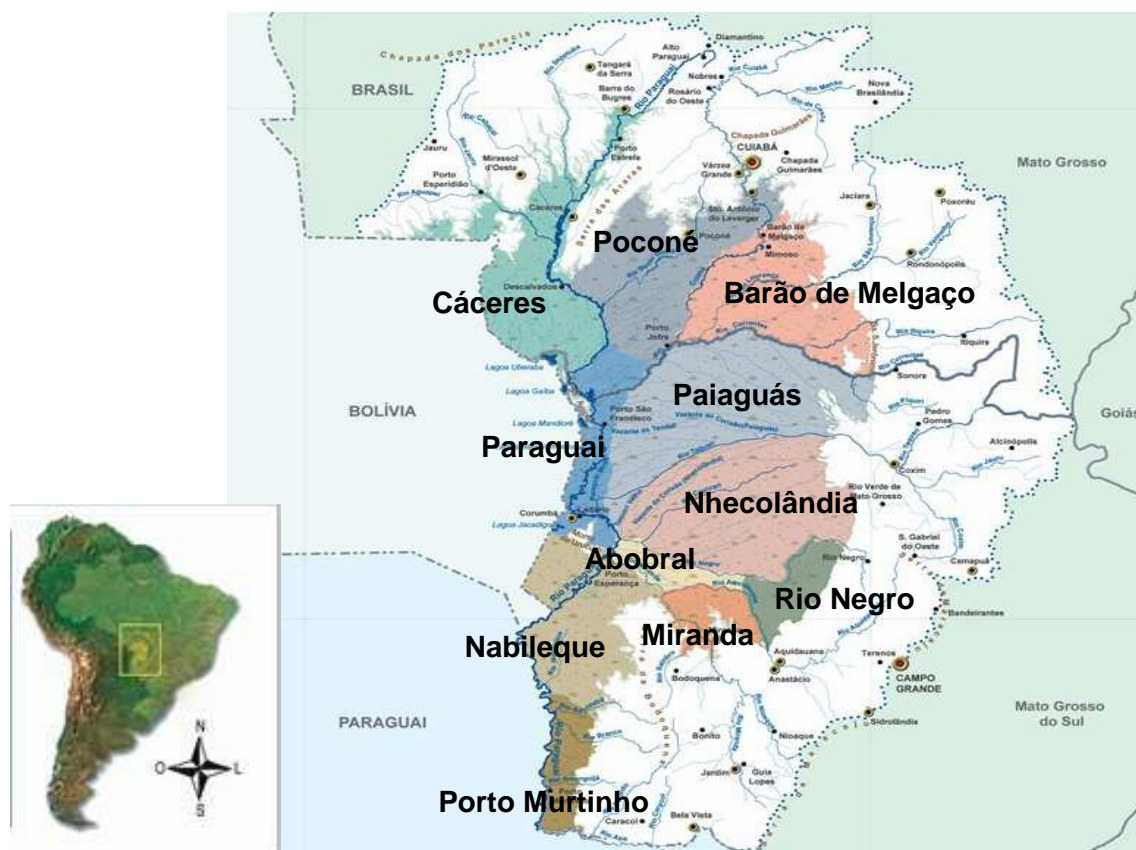


Figura 2: Mapa destacando as sub-regiões do Pantanal.

Fonte: Projeto Pantanal/ alto Paraguai: http://www.ana.gov.br/gefap/arquivos/Sub_regioes.jpg

2.1.1 Sub-região da Nhecolândia

É a segunda maior sub-região, ocupando 19,48% da área do Pantanal brasileiro (SILVA & ABDON, 1998). A maior parte de suas terras está localizada no município de Corumbá no estado do Mato Grosso do Sul e uma pequena parte no município de Rio Verde de Mato Grosso e Aquidauana. É limitada ao norte pela sub-região Paiaguás, ao sul pela Abobral e Aquidauana, ao leste pelo pântano central e a oeste pelo rio Paraguai. Abrange a área situada entre os rios Taquari e Negro.

O clima na sub-região é tropical sub-úmido com estações de cheia e seca bem definidas. A precipitação anual pode atingir até 1.180 mm, sendo a temperatura média anual 25,5°C com máximas absolutas que ultrapassam 40°C e mínimas que se aproxima de 0°C (EMBRAPA, 1997). A região possui paisagens bem

características, sendo compostas por capões, cordilheiras, baías, salinas, vazantes e campos inundáveis (SILVA & ABDON, 1998).

A sub-região da Nhecolândia apresenta áreas sazonalmente alagáveis. O regime de inundação dessa região é classificado como de baixa altura (30 a 40 cm) e de média duração (3 a 4 meses), sendo a superfície inundada estimada em 30% (BRASIL, 1979).

2.1.2 Sub-região do Rio Negro

Também citada por alguns autores como sub-região de Aquidauana, a sub-região do Rio Negro ocupa 3,62% da área do Pantanal brasileiro (SILVA & ABDON, 1998). Apresenta como limites ao norte, a sub-região da Nhecolândia, ao sul, a própria cidade de Aquidauana, a leste, a serra de Aquidauana, a oeste, a sub-região de Miranda e Abobral.

A sub-região do Rio Negro, assim como a de Miranda, também é definida como Pantanal alto, cujas cheias dependem mais de chuvas locais do que inundação por rios, sendo menos afetada pelas enchentes do que as outras sub-regiões.

A sub-região do Rio Negro se assemelha as sub-regiões de Abobral e Nhecolândia. A área do rio Negro, em rigor, é um prolongamento natural da Nhecolândia, mostrando a presença de baías, salinas e solo arenoso, sobre o qual se assenta a pastagem (ALLEM & VALLS, 1987).

O clima da região pode ser caracterizado como tropical, com precipitação total anual de 1.182 mm. Há duas estações bem definidas, o período chuvoso de novembro a março, quando ocorrem 72% da precipitação total anual, e um período seco, que vai de abril a outubro. A temperatura média anual é de 26,6°C. A temperatura máxima absoluta registrada para esse período foi de 44°C em abril de 2002 enquanto a mínima absoluta foi 7°C em julho de 2002 e agosto de 2003 (DA SILVA & AMARAL, 2007).

2.2 Porco monteiro

O porco selvagem (*Sus scrofa*, Linnaeus 1758) teve sua origem no porco doméstico, que escapou ou foi abandonado, e se adaptou a viver livre (PULLAR,

1953). Os suínos foram introduzidos no Pantanal na época da colonização, junto com bovinos, galinhas e perus. Na guerra do Paraguai, as fazendas foram abandonadas e o porco se embrenhou pelas matas, adaptando-se à vida livre. Em poucas gerações, transformaram-se rapidamente e adquiriram características de seus ancestrais selvagens. O porco asselvajado foi denominado “puercos del monte” e, posteriormente, por expressão coloquial passaram a ser chamados de porco monteiro (HERRERA, 1995).

Algumas modificações dos porcos selvagens foram essenciais para sua adaptação e sobrevivência no novo ambiente, como um corpo robusto e musculoso melhor adaptado para fugir dos predadores, cabeça pontuda com um focinho longo desenvolvidos especialmente para revolver a terra, e caninos compridos e direcionados lateralmente. Possuem pêlo grosso com cerdas mais longas no dorso, formando uma crista (HERRERA, 1995). Suas orelhas são pontudas e eretas e o rabo moderadamente longo com pouco pêlo, e nunca formando espiral como o rabo de um porco doméstico (figura 3). A pelagem da maioria é preta, porém alguns são encontrados na cor vermelho-escuro (TISDELL & TAKAHASHI, 1988). Também já foram avistados animais de cores diferentes do preto e vermelho, porém esses são resultados de cruzamentos entre porco monteiro e doméstico.



Figura 3: Porco selvagem do Pantanal brasileiro.
Fonte: Arquivo pessoal

Os porcos monteiros avistados em áreas mais afastadas das fazendas são mais robustos, fortes e maiores que aqueles avistados nas proximidades das fazendas.

A dieta omnívora e padrões de atividade adaptáveis permitem a esses animais viver em diversos tipos de habitats como brejos, campos e áreas florestadas. Eles podem ter hábitos diurnos ou noturnos, o que depende da estação do ano, clima, pressão de caça e disponibilidade de alimento (GRAVES, 1984).

Preferem vegetação verde, mas consomem uma ampla variedade de alimentos como matéria animal, frutas, grãos, raízes, e junto podem levar fungos, caracóis, ovos de pássaros que fazem ninho no chão, ovos de tartaruga entre outros (CHOQUENOT et al., 1996). São frequentemente observados procurando por minhocas ao redor das baías ou se alimentando de cadáver de gado (DESBIEZ et al., 2009a). Segundo Herrera (1995), 81,6% da dieta desses animais é constituída de vegetais.

Os porcos selvagens possuem grande capacidade proliferativa devido principalmente a sua precocidade reprodutiva, já que a gestação dura, em média, 115 a 120 dias, e podem entrar em reprodução antes de se tornarem adultos quando os ossos não estão ainda completamente soldados (DESBIEZ et al., 2009b). Vivem em grupos formados por 1 a 2 fêmeas e seus filhotes, podendo ocorrer a presença de machos sub-adultos. Quando são surpreendidos por predadores, se dispersam em várias direções (GRAVES, 1984).

Essa espécie exótica é considerada praga em muitos países do mundo e geralmente causam impacto negativo no ecossistema que colonizam. Em 2000 foram considerados pela *World Conservation Union* como uma das piores espécies estrangeira invasora do mundo (IUCN, 2000).

No Pantanal, os porcos selvagens já foram reportados como predadores de filhotes de animais silvestres (ALHO et al., 1988), ovos de aves que nidificam no chão (DESBIEZ et al., 2009a), e também ovos de répteis tais como *Caiman crocodilus yacare* (CAMPOS, 1993). Em áreas de floresta, desenterram plântulas e sementes, podendo afetar a germinação de certas espécies (DESBIEZ & KEUROGHLIAN, 2009; DESBIEZ et al., 2009a), e alguns fazendeiros reclamam de danos causados nas pastagens (MOURÃO, 2002), mas não existem estudos quantitativos sobre estes danos. Devido ao hábito do porco de revolver a terra em busca de alimento, é comum encontrar no Pantanal, extensas áreas de vegetação nativa revolvidas e "banheiras", que são buracos na lama feitos pelos porcos, onde costumam deitar em grupos (HERRERA, 1995).

A população de porco monteiro no Pantanal brasileiro está em expansão, e em 2002 já se estimava uma população aproximada de um milhão de animais dispersos em 10 mil grupos, com uma densidade aparente de 0,07 grupos/km² (MOURÃO et al., 2002). São mais abundantes na sub-região do Rio Negro e nas áreas menos inundáveis da sub-região da Nhecolândia e do Paiaguás (figura 4). O tamanho dos grupos varia de acordo com a sub-região, e de acordo com a época do ano. Os fatores que mais influenciam nessa oscilação é pressão de caça e sobrevivência dos filhotes a predação (MAURO, 2002).

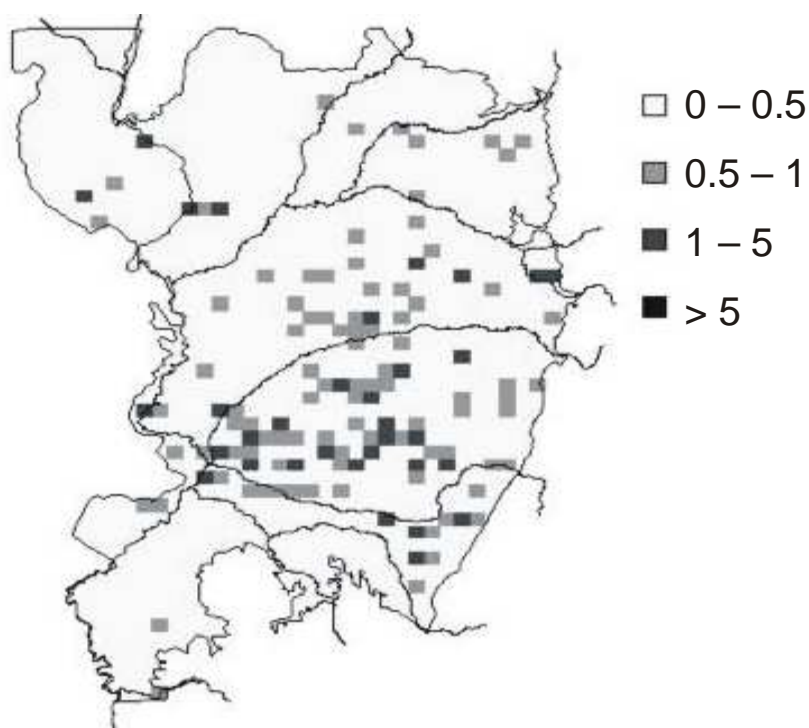


Figura 4: Distribuição das densidades de porco-monteiro (grupos/km²) no Pantanal (setembro de 1991).

Fonte: Mourão et al., 2002.

Devido a essa grande abundância no Pantanal, esses animais vêm sendo caçados pelos moradores locais para obtenção de carne e banha. A ingestão de sua carne intensifica-se na estação das chuvas, dada a dificuldade de secagem da carne bovina, por insuficiência de horas-sol. Em estudo feito na Nhecolândia, Lourival (1993) observou que 60% de toda a caça na região é de porco monteiro. Essa caça é baseada na Lei Federal 5197 de 03 de janeiro de 1967 (BRASIL, 1967). Embora a

lei proíba a caça de animais selvagens, o artigo 8º parágrafo único, permite a caça de animais domésticos que por abandono tenham se tornado selvagens. Alguns machos são capturados, castrados e soltos, para obter indivíduos mais gordos quando recapturados, mas antes, têm a cauda amputada para marcação e posterior identificação no campo (LOURIVAL, 1993; DESBIEZ, 2007). Devido a essa preferência pela caça de porcos monteiros, a fauna silvestre raramente é caçada pelos moradores locais e, dessa forma, a espécie age como substituta dos animais autóctones (DESBIEZ, 2007).

Com o aumento do interesse mundial em carnes de animais exóticos, e considerando que o porco monteiro possui potencial para exploração econômica, existe a possibilidade de utilização do porco monteiro como fonte de renda alternativa para a região.

2.3 Aspectos sanitários do porco monteiro

Estudos sobre a fauna pantaneira são pouco frequentes, apesar disso existe crescente aumento da contribuição científica, com vistas ao melhor conhecimento sobre os animais que vivem nas grandes planícies, principalmente aqueles ameaçados de extinção ou de interesse econômico, através da caça ou pesca. Entre esses animais está o porco monteiro, cuja caça é a mais predominante na região pantaneira.

Estudos em diversos países mostram que o porco selvagem é reservatório de um grande número de vírus, bactérias e parasitas que são transmissíveis para animais domésticos e humanos (HAMPTON et al, 2006; MENG et al, 2009). Porém, há poucos estudos sobre o perfil sanitário do porco selvagem do Pantanal brasileiro. Pesquisas mostraram que o porco monteiro é hospedeiro de alguns parasitas que infectam o homem como o *Trypanossoma cruzi* e *T. evansi* (HERRERA et al., 2005), do vírus da Doença de Aujeszky (FREITAS et al., 2004; PAES, et al., 2009), *Brucella* spp. (PAES, et al., 2009) e de leptospiros, agente etiológico da leptospirose (GIRIO et al., 2004; PAES, et al., 2009).

O porco monteiro compartilha o mesmo ambiente com a fauna nativa, bovinos e outros animais domésticos, e o hábito do porco de revolver a terra em busca de alimento e rolar na lama facilita o contato com excrementos desses animais,

possibilitando o intercâmbio de microrganismos e doenças. Somado a este contexto ecológico está o fato desta espécie ser o principal alvo de caça pela população local, colocando o homem e animais domésticos usados na caça em estreito contato durante a prática da caça tradicional (LOURIVAL, 1993), o que também é um fator para transferência microbiana. Essa hipótese é sugerida em casos onde caçadores apresentam meningite e septicemia causada por *Streptococcus suis*, adquirido de porcos selvagens, após a caça desses animais (ROSENKRANZ et al., 2003).

Jay et al. (2007), sugerem a possibilidade de transmissão microbiana através do meio ambiente, quando relatam um surto de *E. coli* O157:H7 ligado ao consumo de espinafre, que debilitou 205 pessoas e levou três a óbito. Neste estudo, isolaram *E. coli* O157:H7 do solo, água e de porcos ferais e bovinos que viviam nas proximidades da fazenda que produziu o lote de espinafres contaminados. Tanto porcos ferais quanto bovinos possuíam *E. coli* O157:H7 do mesmo subtipo, sugerindo que podem ter contaminado os espinafres ou o ambiente. Esse fato também sugere uma transmissão suíno-suíno, transmissão entre o gado e suínos ou uma fonte comum de exposição, como água ou solo.

Considerando-se a questão econômica do uso do porco monteiro como fonte alimentar e a preservação da região pantaneira, a microbiota destes animais não é conhecida nem os riscos microbiológicos que oferecem aos consumidores e pessoas e animais que estão em contato com eles.

Visando o melhor conhecimento das condições sanitárias do porco monteiro, foi criado um projeto em parceria com várias instituições, para estudo deste animal. O projeto tem como objetivo avaliar o status sanitário do porco monteiro do Pantanal através da pesquisa de brucelose, leptospirose, Doença de Aujeszky, presença de endo e ectoparasitas, resistência a drogas e patogenicidade da microbiota destes animais, além de conhecer a área necessária à manutenção e ao desenvolvimento do porco monteiro, estimar a capacidade de dispersão e investigar a variabilidade genética desses animais na região. O desenvolvimento deste projeto envolve parcerias entre a Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul (IAGRO), Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (EMBRAPA-CPAP), Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ), Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF/RJ) e UNIGRANRIO.

Neste trabalho será enfocada a patogenicidade e resistência a drogas

antimicrobianas da microbiota que coloniza o porco monteiro do Pantanal, assunto sob o qual não há estudos nesta região.

2.3.1 Bactérias patogênicas

Estudos têm mostrado claramente que porcos selvagens podem agir como reservatórios de bactérias zoonóticas como *Mycobacterium bovis*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Yersinia*, *Listeria*, *Leptospira*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157 e *Salmonella* spp. (HAYASHIDANI et al., 2002; WAHLSTRÖM et al., 2003; MENG et al., 2009).

Bactérias que compõem a microbiota normal de humanos e animais, como *E.coli* e *Staphylococcus*, podem estar presentes em sua forma patogênica causando infecção ou não. Porcos selvagens infectados com essas cepas patogênicas podem transmiti-las para a fauna nativa, animais domésticos e humanos através do contato direto, contato com as fezes, solo, água ou consumo de carne infectada (HAMPTON et al., 2006; JAY et al., 2007; MORGAN, 2008).

Escherichia coli

E. coli é um microrganismo habitante normal do trato gastrointestinal dos animais, sendo eliminado nas fezes dos mesmos e desta forma contaminando o ambiente. Por contato com estas fontes ambientais de *E. coli* é que ocorre a colonização do trato intestinal de mamíferos logo após o nascimento. Essa bactéria persiste como membro importante da microbiota normal do intestino por toda a vida do seu hospedeiro (MURRAY et al., 2002). Todavia, existem algumas cepas de *E. coli* oportunistas e cepas patogênicas que expressam fatores de virulência e podem causar desordens intestinais (*E. coli* diarreio gênicas) e extra-intestinais (RUSSO & JOHNSON, 2000; KAPER et al., 2004).

Genes que codificam para fatores de virulência, tais como adesinas, invasinas, toxinas, sideróforos, cápsula, fator necrotizante citotóxico e hemolisinas estão envolvidos em mecanismos de patogenicidade em *E. coli*. (NATARO & KAPER, 1998).

De acordo com a produção de fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia as *E. coli* são subdivididas e diferentes patotipos, os principais são: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (NATARO & KAPER, 1998). Vários desses patotipos de *E. coli* têm sido implicados em doenças diarréicas, se constituindo num grave problema de saúde pública no mundo, com mais de dois milhões de mortes relatadas, a cada ano (NATARO & KAPER, 1998).

E. coli enteropatogênica (EPEC) é agente etiológico bem estabelecido de diarreia infantil humana, entretanto, muitos adultos são considerados portadores não apresentando sintomas da doença, levando a crer que a imunidade adquirida ocorra com o passar do tempo (PADHYE & DOYLE, 1992). Sua virulência está associada a capacidade de aderir e destruir as células intestinais, promovendo a destruição das microvilosidades das células epiteliais e desencadeando uma lesão histopatológica no epitélio do intestino, denominada lesão A/E (*attaching and effacing*) (PATON & PATON, 1998). A patogênese de EPEC está associada a fatores de virulência como intimina, uma proteína de membrana externa que medeia a aderência de EPEC as células epiteliais; fímbrias chamadas BFP ("*bundle forming pillus*"), necessárias para aderência bacteriana; proteína EspA, que é essencial para transdução de sinal nas células epiteliais; proteína EspB, essencial para transdução de sinal na formação de lesão A/E, entre outros (NATARO & KAPER, 1998).

Existem duas categorias de EPEC, denominadas EPEC típica e EPEC atípica. As características comuns às duas categorias são a não produção de toxina Shiga (Stx) e ambas serem capazes de causar a lesão A/E. As principais diferenças referem-se aos sorotipos e à presença de plasmídeo EAF somente nas EPEC típicas (TRABULSI, 2005).

E. coli enterotoxigênicas (ETEC) são causa de diarreia aquosa no homem e em animais, pela produção de toxinas termoestáveis (STa e STb), termolábeis (LT-I e LT-II) ou ambas (TRABULSI, 2005). Além de produzir toxinas, apresentam fímbrias, cuja função é fixá-las à mucosa do intestino delgado, conhecidas como fatores de colonização (TRABULSI, 2005).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) causa várias doenças no homem, sendo bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente similar à *Shigella* spp. Ambas

causam colite inflamatória invasiva. A doença envolve invasão e espalhamento celular, em que genes cromossomais e plasmidiais estão envolvidos (NATARO & KAPER, 1998).

Cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) estão relacionadas a casos de doenças veiculadas por alimentos. Essas cepas produzem toxinas do tipo *shiga-like* (stx1 e stx2) e suas variantes, e por isso são alternadamente denominadas de *E. coli* produtora de Toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* produtora de Verocitotoxina (VTEC). O sorotipo de importância destacada é o O157:H7, associado à colite hemorrágica, diarreia com sangue e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (TRABULSI, 2005).

A capacidade patogênica de EHEC reside em um número de fatores de virulência, incluindo as toxinas Shiga (stx1 e Stx2), intimina, enteroemolisina e a adesina autoaglutinante STEC (Saa) (GYLES, 2007). Em linhagens de tecidos, as EHEC aderem intimamente às células, produzindo o mesmo tipo de lesão A/E observadas em amostras de EPEC. Essa adesão íntima está associada também a intimina, codificada pelo gene *eae* (TRABULSI, 2005).

E. coli O157:H7 e cepas STEC não O157 têm sido isoladas de ruminantes selvagens (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2007; SÁNCHEZ et al., 2009). Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que os suínos domésticos são hospedeiros competentes e um potencial reservatório de *E. coli* O157:H7 (FEDER et al., 2003; CORNICK & HELGERSON, 2004). Cepas de *E. coli* O157:H7 foram identificadas em porcos selvagens na Suécia (WAHLSTRÖM et al., 2003) e nos Estados Unidos (JAY et al., 2007). Na Espanha, STEC não O157 foram isoladas de 11 animais em estudo realizado com fezes de 212 porcos selvagens (SÁNCHEZ et al., 2010).

Devido à onipresença da *Escherichia coli* em fezes de animais e ao hábito dos suínos de rolar na lama, essas bactérias comumente alcançam carcaças e cortes de carne durante o abate e o processamento, além de poder ser transferidas a outros animais e humanos que estão em estreito contato com os suínos (GILL & JONES, 1998; JAY et al., 2007; KOZAK, et al., 2009).

E. coli isoladas de animais sadios ou amostras ambientais têm apresentado genes que codificam para fatores de virulência (MARTINS et al., 2000; SCHIERACK et al., 2006), sugerindo o potencial patogênico independente de estar causando doença clínica.

Staphylococcus

Os *Staphylococcus* spp. são comumente encontrados na pele e mucosas de humanos e animais de sangue quente, no entanto algumas espécies deste gênero são importantes causadores de intoxicações alimentares e infecções humanas e animais.

Uma das toxinas produzidas por *Staphylococcus* é TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) reconhecida como causa de choque tóxico em humanos, caracterizado por febre, hipotensão, congestão de diversos órgãos e choque letal (BERGDOLL & SCHLIEVERT, 1984; MONDAY & BOHACH, 1999).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são responsáveis pela intoxicação alimentar, provocada após a ingestão de alimento contaminado com *Staphylococcus* ou a toxina produzida previamente. Os sintomas característicos da intoxicação são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia.

Para a intoxicação ser desencadeada a toxina precisa estar acumulada numa dose adequada, sendo necessária para sua produção, entre outros fatores, uma concentração de 10^6 bactérias por grama de alimento (RODRIGUES et al., 2004). No entanto, a ingestão destas toxinas na maioria dos eventos não é letal (BENNETT, 2001).

Enterotoxinas estafilocócicas tem sido classificadas de acordo com suas diferenças sorológicas (CASMAN, 1960). Elas são denominadas de *Staphylococcal enterotoxin A* (SEA), *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB), *Staphylococcal enterotoxin C* (SEC), *Staphylococcal enterotoxin D* (SED) e *Staphylococcal enterotoxin E* (SEE).

As SEs são resistentes a inativação pelas proteases gastrointestinais, como pepsina e tripsina, bem como pelo calor. Durante o cozimento a bactéria é destruída, mas as toxinas secretadas resistem ao calor e permanecem no alimento ocasionando gastroenterite estafilocócica nos consumidores (BENNETT, 2001).

A transmissão de *Staphylococcus* toxigênico de animais para o homem através da ingestão de sua carne ou através de contato direto é um fator de risco considerável, em especial em grupos de pessoas mais sensíveis. Muitos estudos têm demonstrado que a transferência de microorganismos entre animais de fazenda e humanos é uma realidade (ANGULO et al., 2004; ARMAND-LEFEVRE et al., 2005; MORGAN, 2008).

2.3.2 Resistência bacteriana

O aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos é um fenômeno observado em todo o mundo, e não se restringe a isolados humanos, mas também entre animais domésticos e no ambiente rural (GUARDABASSI et al., 2004; BANCROFT, 2007). Os seres humanos e animais de companhia são os principais portadores de microrganismos resistentes devido à freqüente exposição às drogas (BUTAYE et al., 2001; PEDERSEN et al., 2007), porém com a introdução de drogas na prática pecuarista e na agricultura, bactérias resistentes têm surgido também nos animais de produção como porcos e gado e outras espécies domésticas (BATES, 1997; AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

Existem quatro mecanismos gerais de resistência, todos controlados pela ação de genes específicos: inativação enzimática ou alteração de agentes antimicrobianos, impermeabilidade da parede celular ou membrana de bactérias, expulsão ativa da droga pela bomba de efluxo celular, e alteração nos receptores alvo (PRESCOTT et al., 2000).

Resistência a drogas pode ser adquirida como resultado de mutações cromossômicas ou por troca de material genético entre bactérias. Genes de resistência a agentes antimicrobianos são adquiridos pelas bactérias através de elementos móveis, como plasmídeos, transposons, e integrons, que resultam em mutações nos genes responsáveis pela absorção de agentes antimicrobianos ou sítios de ligação ou a ativação de partes do cromossoma bacteriano (ALEKSHUN et al., 1999; PRESCOTT et al., 2000).

A resistência bacteriana às drogas é considerada um sério problema de Saúde Pública, pois uma vez adquirido, os genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias, e esse mecanismo bacteriano pode estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (MORGAN, 2008; ALLEN et al., 2010).

Um estudo na província francesa mostrou a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos colonizando porcos e tratadores de porcos, sugerindo uma transferência desses microrganismos. O estudo foi baseado na análise molecular de *Staphylococcus aureus* com a identificação de clones resistentes presentes na microbiota nasal de tratadores de porcos, com fortes indícios de terem originado de suínos nas propriedades rurais ou vice-versa (ARMAND-LEFEVRE et al., 2005).

Bactérias da microbiota intestinal de animais, entre eles os *Enterococcus* e *E. coli*, têm grande facilidade para adquirir resistência aos antibióticos e disseminar esse gene para outras espécies bacterianas (VAN DEN BOGAARD & STOBBERINGH, 2000).

Os animais selvagens não são normalmente expostos a agentes antimicrobianos, mas através de interações diretas e indiretas com os seres humanos, alimentos e animais domésticos, podem entrar em contato com bactérias resistentes. Tal contato pode ser o responsável pela disseminação de bactérias resistentes e transferência horizontal de genes de resistência antimicrobiana entre bactérias de populações de animais selvagens (ALLEN et al., 2010). Vários estudos sustentam essa hipótese demonstrando que as taxas de resistência a antimicrobianos são mais elevadas entre animais que vivem perto dos seres humanos e zonas agrícolas, que entre os animais selvagens que residem em regiões mais isoladas (SKURNIK et al., 2006; BLANCO et al., 2007). Bactérias isoladas de animais selvagens cujo habitat é compartilhado com os seres humanos são mais propensas a serem resistentes aos antimicrobianos que aquelas isoladas de áreas com menor ação antrópica (OSTERBLAD et al., 2001; KOZAK et al., 2009). A aquisição de genes de resistência em populações selvagens e de vida livre é uma preocupação, pois poderia surgir um reservatório ambiental de resistência antimicrobiana em animais que normalmente não têm qualquer contacto com antimicrobianos (HUDSON et al., 2000; ALLEN et al., 2010).

Não há na literatura disponível trabalhos sobre a resistência bacteriana em porcos selvagens do Pantanal, porém alguns estudos vêm sendo realizados em outros países em porcos selvagens, principalmente com referência a *E. coli*. Schierack et al. (2009), estudando 42 cepas de *E. coli* isoladas de seções intestinais de 21 porcos selvagens na Alemanha, verificaram que todas as cepas foram sensíveis às drogas testadas. Na República Tcheca, de 290 *E. coli* isoladas da cavidade anal de porcos selvagens, apenas 17 apresentaram resistência a ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ácido nalidixico, estreptomicina, sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazole e tetraciclina (LITERAK et al, 2009). Cepas de *E. coli* O157:H7 foram isoladas de porcos selvagens na Suécia (WAHLSTRÖM et al., 2003), nos Estados Unidos (JAY et al., 2007) e Espanha (SANCHEZ et al., 2010), porém sua resistência aos antimicrobianos não foi testada.

Em Portugal, o trabalho realizado com 134 amostras de *Enterococcus* de

porcos selvagens (67 *E. faecium*, 54 *E. hirae*, 02 *E. faecalis*, 02 *E. durans* e 09 *Enterococcus* spp.) revelou alta resistência frente a três drogas, eritromicina, tetraciclina e ciprofloxacino, enquanto a resistência contra ampicilina foi a mais baixa entre as 11 drogas testadas (POETA et al., 2007a).

Tendo em vista o pouco conhecimento referente à microbiota de porcos selvagens do Pantanal brasileiro, esse estudo tem como objetivo identificar parte da microbiota bacteriana que coloniza o porco selvagem do Pantanal e caracterizá-los quanto ao perfil de resistência a drogas antimicrobianas e produção de toxinas e analisar genes de patogenicidade e de resistência a antimicrobianos em *E. coli*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* isolados de porco selvagem.

**CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS
DA MICROBIOTA BACTERIANA QUE COLONIZA PORCO MONTEIRO NO
PANTANAL.**

3. OBJETIVOS

Caracterizar bactérias que colonizam porcos selvagens (*Sus scrofa*) do Pantanal brasileiro;

Estabelecer o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas das bactérias isoladas;

Avaliar a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pelas cepas de *Staphylococcus* isoladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de Amostras

Foram realizadas duas viagens ao Pantanal do Mato Grosso do Sul para coleta de material. A primeira viagem foi realizada em agosto de 2008, para a sub-região do Rio Negro (19°30'S e 55°36'O), fazenda Santa Emília onde fica localizado o Instituto de Pesquisa do Pantanal (IPPAN) vinculado a UNIDERP, onde foram coletadas amostras de dez porcos monteiros, sendo 3 fêmeas e 7 machos. Na segunda viagem, em outubro de 2008, na sub-região da Nhecolândia (18°59'S e 56°39'O), fazenda Nhumirim, foram coletadas amostras de doze porcos monteiros, sendo 9 fêmeas e 3 machos.

Os animais utilizados no estudo foram capturados distantes de áreas habitadas pelo homem. Para tal, a equipe utilizou transporte mecânico (trator) e animal (cavalo) para busca desses animais, que quando avistados eram perseguidos a cavalo pelos peões da fazenda que utilizaram cães para acuar os porcos, e então capturá-los a laço.

Os animais capturados foram imobilizados, identificados com brincos plásticos na orelha esquerda, sexados e tiveram a idade estimada pelos peões baseada na dentição. Depois de ser feita a coleta, foram novamente devolvidos à natureza na mesma área onde foram capturados. Todos os animais possuíam coloração preta e se apresentavam aparentemente saudáveis.

Com auxílio de suabes microbiológicos estéreis (Copan Diagnostics, Itália), foram coletadas amostras de seis regiões corporais do porco monteiro: cavidade oral, canal auricular esquerdo e direito, mucosa do reto, narina e prepúcio ou vagina. Todo material coletado foi mantido sob refrigeração e enviado ao Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF/RJ.

4.2 Processamento microbiológico

4.2.1 Isolamento microbiano

No laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, cada suabe foi semeado em uma placa contendo ágar Chocolate (Acumedia, EUA) adicionado de 5% de sangue de cavalo desfibrinado e estéril e suplemento VX (Laborclin, Brasil), para isolamento das colônias bacterianas, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. As diferentes colônias foram semeadas em ágar sangue (Acumedia, EUA) adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e estéril, para verificação do padrão de hemólise. Após incubação a 37°C por 24 horas, foi realizada a observação macroscópica e morfotintorial das colônias pelo método de Gram.

4.2.2 Identificação bacteriana

As colônias definidas como bastonetes Gram-negativos foram submetidas ao teste de catalase e oxidase (Dry slide-Difco, EUA), e semeadas em ágar MacConkey (Acumedia, EUA). Colônias catalase positivo e oxidase negativo, foram submetidas ao teste IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato Simmons), e quando necessário, foram inoculadas em meios seletivos como Eosin Methylene Blue (Acumedia, EUA) e Salmonella-Shigella (Acumedia, EUA), e realizados testes bioquímicos adicionais (manitol, sacarose, xilose, maltose, arabinose, lisina, ornitina, inositol, sorbitol, H₂S, motilidade, DNase e urease). Colônias catalase e oxidase positiva foram semeadas em ágar Cetrimide (Acumedia, EUA) para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Aquelas que não apresentaram crescimento neste meio foram caracterizadas pelo kit miniaturizado ID 32 GN, para bactérias Gram-negativas, e interpretadas pelo software miniApi (bioMérieux, França) (figura 5).

Cocos Gram-positivos foram submetidos à prova da catalase para diferenciar Streptococcaceae e Micrococcaceae. Para diferenciação dos gêneros da família Streptococcaceae, foram efetuados os testes de tolerância ao NaCl 6,5%, crescimento em ágar Bile-Esculina (Difco, EUA) e teste PYR (Pyrrolidonyl arylamidase) (PROBAC, Brasil). A diferenciação dos gêneros da família

Micrococcaceae foi realizada através dos testes da oxidase, susceptibilidade a bacitracina (Cefar, SP, Brasil) e susceptibilidade a furazolidona (Cefar, SP, Brasil). Colônias classificadas como *Staphylococcus* spp. foram submetidas aos testes de DNase (Difco, EUA) e coagulase (Difco, EUA) (figura 5).

Para confirmação do gênero e classificação da espécie, quando necessário, foram utilizados kits padronizados miniaturizados (ID32 Staph, para micrococaceas, ID32 Strep para estreptococaceas, ID32 E para enterobactérias e ID 32 GN para bactérias Gram-negativas) e interpretadas pelo software miniApi (bioMérieux, França).

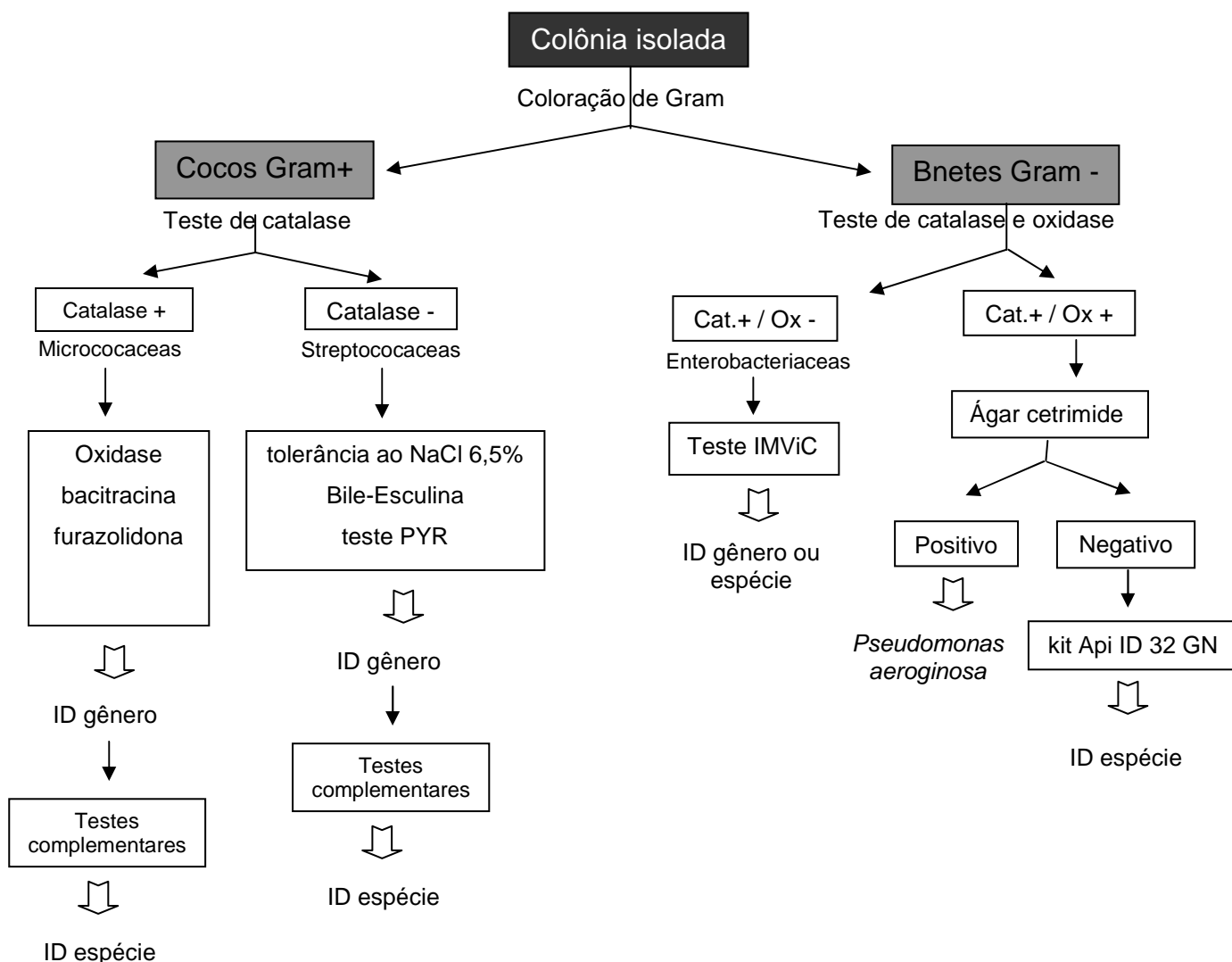


Figura 5: Esquema de identificação de isolados bacterianos.

4.3 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos das colônias isoladas foi testada através da técnica de difusão em ágar, realizada de acordo com as normas da NCCLS (2003), utilizando-se discos impregnados com os antibióticos (Cefar, SP, Brasil).

Colônias puras cultivadas por 24 horas a 37°C foram suspensas em solução salina estéril 0,9%, de modo a obter uma turbidez igual a 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL) na escala de McFarland, medida em fotômetro com leitura de DO_{550nm} (Densimat, bioMérieux, França). Um suabe estéril foi umedecido nesta suspensão e semeado em ágar Muller Hinton (Acumedia, EUA). Um disco de cada antibiótico (Cefar, SP, Brasil) foi depositado na placa, a qual foi incubada a 37°C durante 24 horas. A leitura do diâmetro dos halos foi realizada com auxílio de um paquímetro e a interpretação dos resultados foi de acordo com a tabela padrão do fabricante.

As drogas testadas para bactérias Gram-positivas foram Amoxicilina (AMO, 30µg), Ampicilina (AMP, 10µg), Cefalotina (CFL, 30µg), Cefoxitina (CFO, 30µg), Clindamicina (CLI, 2µg), Cotrimoxazol (SUT, 25 µg), Eritromicina (ERI, 15µg), Gentamicina (GEN, 10µg), Oxacilina (OXA, 1µg), Penicilina G (PEN, 10U), Tetraciclina (TET 30µg) e Vancomicina (VAN, 30µg). Para as bactérias Gram-negativas foram testadas Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC 20/10µg), Ampicilina (AMP, 10µg), Cefalotina (CFL, 30µg), Cefoxitina (CFO, 30µg), Ciprofloxacino (CIP 5µg), Cloranfenicol (CLO 30µg), Cotrimoxazol (SUT, 25µg), Enrofloxacina (ENO 5µg), Gentamicina (GEN, 10µg), Tetraciclina (TET 30µg) e Tobramicina (TOB 10µg).

Os isolados de *Enterococcus* que apresentaram reduzida susceptibilidade ou resistência a vancomicina foram testados novamente para essa droga e submetidos a análise molecular para pesquisa de genes *van*, que conferem resistência a esse antimicrobiano.

4.4 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs)

A produção de enterotoxinas pelos estafilococos foi testada por ELISA com uso de kit comercial *Tecra Staphylococcal Enterotoxin (SET) VIA* (TECRA Bioenterprises, Austrália). O kit utilizado detecta a presença da enterotoxina, mas

não identifica qual delas está sendo produzida.

Seguindo as instruções do fabricante, os *Staphylococcus* spp. isolados foram cultivados em meio líquido (*Staphylococcus* broth, TECRA, Austrália), incubados *overnight* a 37°C e centrifugados a 3.000g durante 10 minutos. O pH do sobrenadante foi verificado com fitas de pH (Merck, Alemanha) e ajustado para 7.0 - 8.0 quando necessário. Um mililitro de sobrenadante foi adicionado a 50µl de *sample additive*, esta solução foi a utilizada no teste. Uma placa de ELISA, com anticorpos SEA, SEB, SEC, SED e SEE adsorvidos a superfície dos poços, foi coberta com *Wash solution* e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente para uma pré-lavagem dos poços. A solução foi descartada, adicionado 200µl da solução com o sobrenadante nos poços, a placa foi embalada em plástico filme e incubada durante 2 horas a 37°C (se o antígeno SEs estiver presente no sobrenadante, se liga ao anticorpo nesse momento). As amostras foram descartadas, a placa lavada por quatro vezes com *wash solution* e o resíduo líquido foi todo removido batendo a placa em papel absorvente. Em cada poço foi adicionado 200µl de conjugado (anticorpo específico para SEs ligado a uma enzima), a placa foi embalada em plástico filme e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. O conjugado foi descartado e a placa lavada cinco vezes com *wash solution*. Duzentos microlitros de substrato foi adicionado nos poços e a placa incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. A presença de SEs é indicada quando o conjugado converter o substrato e produzir uma coloração verde. Alternativamente, se SEs for ausente, não há produção de cor. A leitura dos resultados foi realizada visualmente, comparando a cor produzida nos poços com a tabela padrão fornecida pelo fabricante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

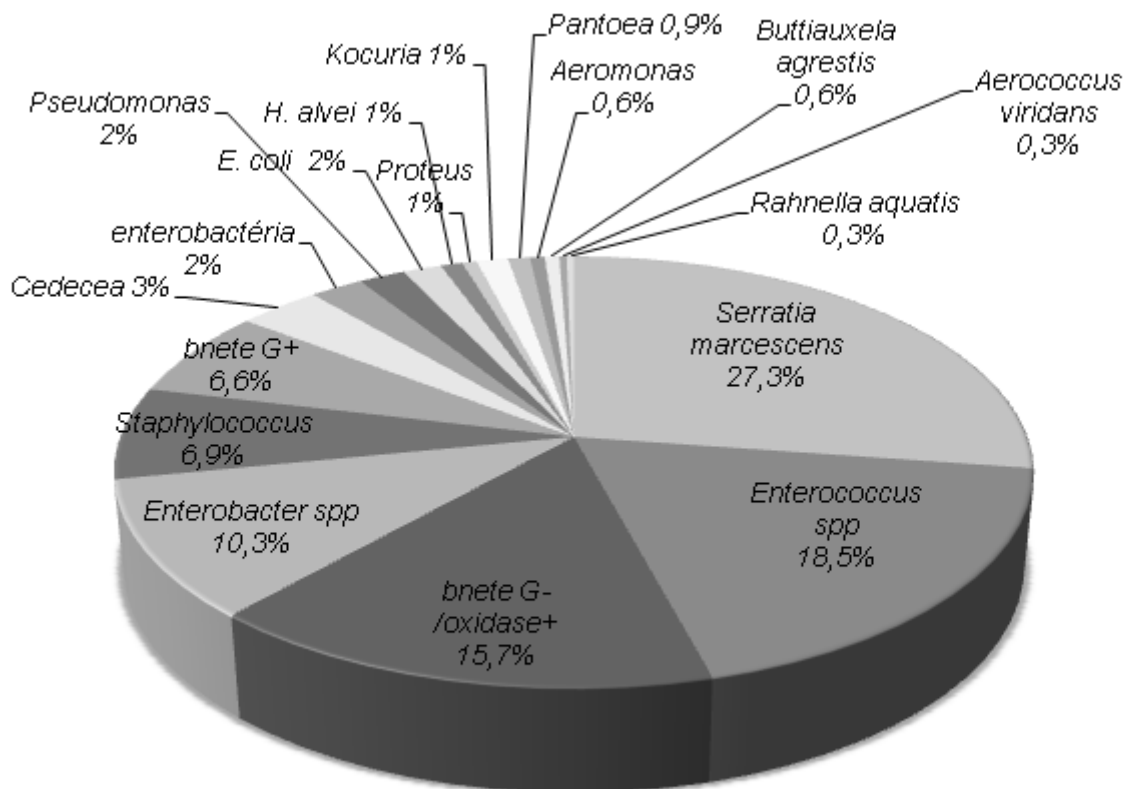
5.1 Microbiota

Após o processamento dos suabes coletados dos 22 animais, foram isoladas 319 bactérias, destas 212 são Gram-negativas e 107 Gram-positivas. Entre as bactérias Gram-negativas foram identificadas 6 *Pseudomonas* (1 *Pseudomonas* spp., 1 *P. fluorescens* e 4 *P. aeruginosa*), 2 *Aeromonas caviae*, 154 Enterobacteriaceas (2 *Proteus* spp., 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Enterobacter amnigenus* biótipo I, 1 *Enterobacter gergoviae*, 1 *Rahnella aquatis*, 2 *Buttiauxella agrestis*, 3 *Hafnia alvei*, 3 *Pantoea* spp., 5 *Escherichia coli*, 11 *Cedecea* spp., 87 *Serratia marcescens*, 29 *Enterobacter agglomerans* e 7 não identificadas) e 50 bastonetes oxidase-positivos não identificados. As bactérias Gram-positivas foram classificadas como um *Aerococcus viridans*, quatro *Kocuria* spp. (3 *K. rosea*, 1 *K. varians*), 22 *Staphylococcus* spp. (8 *S. sciuri*, 7 *S. hyicus*, 5 *S. chromogenes*, 1 *S. warneri*, 1 *S. epidermidis*), 59 *Enterococcus* spp. e 21 bastonetes não identificados (gráfico 1).

Conforme mostra o gráfico e a tabela 1, a bactéria mais frequente neste levantamento foi a *Serratia marcescens* (n=87), a qual foi isolada dos 22 animais de todas as regiões corporais estudadas, e foi mais encontrada na cavidade auricular direita (20 cepas isoladas) e menos frequente na região vaginal (3 isolados) e prepucial (7 isolados). *Serratia marcescens* é uma bactéria ubíqua no ambiente e tem preferência por ambientes úmidos, o que explica sua grande ocorrência no porco monteiro. Como muitas outras enterobactérias, é um patógeno oportunista e agente envolvido em infecções nosocomiais (HEJAZI & FALKINER, 1997).

Enterococcus spp. (n=59) foi isolado de 18 animais (81.8%) e também foi encontrado em todas as regiões corporais estudadas, sendo mais frequente na região anal (19 isolados) e menos frequente na região auricular direita (3 isolados). Esse microrganismo faz parte da microbiota natural da maioria dos mamíferos e aves, mas tem emergido como um importante patógeno humano (MURRAY, 1998).

Gráfico 1: Frequência de bactérias isoladas de porco selvagem (*Sus scrofa*) provenientes do Pantanal sulmatogrossense, no ano de 2008.



Enterobacter (n=33) foi a terceira bactéria mais isolada dos porcos selvagens estudados, sendo encontrada em 17 animais em todas as regiões corporais, e foi mais prevalente na região auricular esquerda (n=9). *Enterobacter agglomerans* é encontrado em água e solo e tem sido ocasionalmente isolado de humanos, mas raramente causa doenças em indivíduos saudáveis (FRASER et al., 2010).

Foram isolados 22 *Staphylococcus* de 13 animais, e foi mais encontrado colonizando a região nasal, menos isolado do prepúcio e isolamento ausente na região anal. O homem e animais podem ser reservatórios desta bactéria, pois a mesma é residente da nasofaringe, boca, trato intestinal e diversas áreas da pele. É responsável por diversas patogenias de importância clínica e epidemiológica, incluindo intoxicação alimentar causada por toxinas produzidas por esses microrganismos (ARCHER, 1998).

Cedecea spp. foi isolada de 7 animais, de todas as regiões corporais estudadas e foi mais frequente na região nasal.

Tabela 1: Bactérias isoladas do porco silvestre (*Sus scrofa*) provenientes do Pantanal sulmatogrossense, no ano de 2008, sua freqüência nas diferentes regiões corporais e número de animais colonizados.

Bactéria (n)	Nariz	Boca	Orelha esquerda	Orelha direita	Reto	Vagina	Prepúcio	Nº de porcos colonizados
<i>Enterococcus</i> (59)	9	4	4	3	19	11	9	18/22
<i>Staphylococcus</i> (22)	7	2	6	2	0	4	1	13/22
<i>Pseudomonas</i> spp. (6)	1	0	2	2	1	0	0	5/22
<i>Kocuria</i> spp. (4)	1	2	0	0	0	1	0	4/22
<i>Aeromonas</i> spp. (2)	1	0	0	0	0	0	1	2/22
<i>Aerococcus viridans</i> (1)	0	0	0	0	0	0	1	1/22
<i>Enterobactérias</i> (n=154)								22/22
<i>Rahnella aquatis</i> (1)	0	0	0	1	0	0	0	1/22
<i>Buttiauxela agrestis</i> (2)	0	0	2	0	0	0	0	1/22
<i>Proteus</i> spp. (2)	0	2	0	0	0	0	0	2/22
<i>Pantoea</i> spp. (3)	0	0	1	1	0	0	1	3/22
<i>Hafnia alvei</i> (3)	0	1	1	1	0	0	0	2/22
<i>Escherichia coli</i> (5)	0	0	0	0	4	1	0	3/22
<i>Cedecea</i> spp. (11)	3	1	2	2	1	1	1	7/22
<i>Enterobacter</i> spp. (33)	7	6	9	5	3	1	2	17/22
<i>Serratia</i> spp. (87)	15	17	15	20	10	3	7	22/22
Não identificadas (7)	0	0	3	1	2	1	0	6/22

Surpreendentemente, *Escherichia coli* foi pouco frequente no porco monteiro (13,6%), onde esteve presente colonizando apenas 3 dos 22 animais estudados, sendo isolada 4 cepas da região anal e uma da região vaginal. Esse organismo está presente na microbiota normal do trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, e geralmente está presente nas fezes (MOLEND, 1994). Algumas linhagens de *E. coli* estão envolvidas em surtos de origem alimentar.

Buttiauxella tem sido isolada de solo, água potável, água de superfície, esgoto e amostras fecais. Ocorre abundantemente no intestino de caracóis, lesmas e outros moluscos (MULLER et al., 1996).

Rahnella aquatilis é amplamente disseminada na natureza: é um microrganismo ambiental e ocorre frequentemente em reservatórios de água e solo, mas também pode propagar no trato gastrointestinal de vários animais e causar um amplo espectro de doenças em humanos. No entanto, possuem baixa capacidade patogênica e a habilidade para infectar humanos depende do status imunológico do indivíduo, portanto é um patógeno oportunista (POKHIL, 1998).

As regiões da orelha esquerda e direita, nariz e boca dos animais estudados estavam mais colonizadas por *Serratia marcescens*, enquanto as regiões do reto, vagina ou prepúcio tinham o predomínio de *Enterococcus* spp. colonizando.

Na cavidade nasal dos animais a maior frequência de isolamento foi de *Serratia marcescens* (n=15), seguida de *Enterococcus* (n=9), *Staphylococcus* e *Enterobacter* (ambos n=7), *Cedecea* (n=3), *Kocuria*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (ambas n=1). Na cavidade oral teve o predomínio de *Serratia marcescens* (n=17), seguida de *Enterobacter* (n=6), *Enterococcus* (n=4), *Staphylococcus*, *Kocuria* e *Proteus* (ambos n=2), *Cedecea* e *Hafnia alvei* (n=1). Na cavidade auricular esquerda *Serratia marcescens* (n=15) também foi isolada em maior número, seguida de *Enterobacter* (n=9), *Staphylococcus* (n=6), *Enterococcus* (n=4), *Pseudomonas*, *Buttiauxella agrestis* e *Cedecea* (n=2), *Pantoea* e *Hafnia alvei* (n=1). Na cavidade auricular direita *Serratia marcescens* (n=20) também foi a mais frequente, seguida de *Enterobacter* (n=5), *Enterococcus* (n=3), *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Cedecea* (ambas n=2), *Rahnella aquatilis*, *Pantoea* e *Hafnia alvei* (ambas n=1).

Já na cavidade anal o predomínio foi de *Enterococcus* (n=19), seguido de *Serratia marcescens* (n=10), *E. coli* (n=4), *Enterobacter* (n=3), *Pseudomonas* e *Cedecea* (ambas n=1). Na região vaginal o predomínio foi de *Enterococcus* (n=11), seguido de *Staphylococcus* (n=4), *Serratia marcescens* (n=3), *Kocuria*, *Cedecea*

Enterobacter e *E. coli* (ambas n=1). Na região prepucial a maior frequência foi de *Enterococcus* (n=9), seguido de *Serratia marcescens* (n=7), *Enterobacter* (n=2), *Staphylococcus*, *Aerococcus viridans*, *Aeromonas*, *Pantoea* e *Cedecea* (ambas n=1), conforme mostra a tabela 1.

A tabela 2, em anexo, mostra as bactérias isoladas de cada porco selvagem estudado e suas respectivas regiões de isolamento.

Não são conhecidos, na literatura disponível, trabalhos sobre a microbiota de porcos selvagens. Alguns trabalhos têm sido realizados com bactérias específicas nesses animais em outros países.

Poeta et al. (2007a) isolaram 134 *Enterococcus* de amostras fecais de 67 porcos selvagens em Portugal. Entre esses isolados havia 67 *E. faecium*, 54 *E. hirae*, 2 *E. faecalis*, 2 *E. durans* e 9 *Enterococcus* spp. Essa espécie é muito frequente em isolados fecais, e Poeta et al. (2007a), isolaram uma média de 2 *Enterococcus* por animal, enquanto nos porcos selvagens do Pantanal brasileiro foram isolados apenas 1 *Enterococcus*/animal.

Baums et al. (2007), em estudo com 200 porcos selvagens saudáveis na Alemanha, isolaram *Streptococcus suis* de 92% deles, sugerindo que esses animais podem ser carreadores desse patógeno zoonótico. Discordando desses achados, nenhum *Streptococcus* foi isolado de porcos selvagens do Pantanal brasileiro, no presente estudo.

Estudos relacionados ao isolamento de *Staphylococcus* spp. em porcos selvagens são escassos. Van Dijck & Van de Voorde (1979), não isolaram *Staphylococcus* das fezes de porcos selvagens de vida livre nas florestas da Bélgica, porém isolaram *E. coli* do ceco desses animais e de animais em cativeiros. No presente estudo com porcos selvagens do Pantanal brasileiro, foram isolados *Staphylococcus* em 59% dos animais em todas as regiões corporais estudadas, exceto o reto. O elevado número de animais colonizados por *Staphylococcus* se deve ao maior número de superfícies corporais estudadas nos animais do presente trabalho, enquanto no trabalho de Van Dijck & Van de Voorde (1979), foram estudadas apenas as fezes dos animais.

Estudos têm sido realizados com *E. coli* em porcos selvagens em diversos países. Na Alemanha, Schierack et al. (2009), em um estudo de caracterização de *E. coli* de porcos selvagens, isolaram a bactéria de secções intestinais de todos os animais estudados. *E. coli* também foi isolada de porcos selvagens na Suécia

(WAHLSTRÖM et al., 2003), Estados Unidos (JAY et al., 2007), República Tcheca (LITERAK et al., 2009) e Espanha (SANCHEZ et al., 2010).

A frequência de isolados de *E. coli* no presente trabalho foi baixa, apenas 13,6% dos porcos estudados foram carreadores de *E. coli*, porém, em trabalho realizado em 2006 em porcos selvagens da sub-região da Nhecolândia no Pantanal, Paes et al. encontraram 73,5% dos animais colonizados por *E. coli* (dados não publicados). Essa diferença de número de animais colonizados por *E. coli* provavelmente é decorrente do período que foram realizadas as coletas. Em 2006 as amostras foram coletadas dos animais no mês de janeiro, período de enchente, onde a veiculação hídrica de microrganismos é maior, enquanto no presente estudo as amostras foram coletadas em período de seca (agosto) e início da enchente (outubro).

Alguns estudos direcionados para a pesquisa de bactérias patogênicas específicas foram realizados em porcos selvagens destinados à alimentação. Estudando a qualidade microbiológica da carcaça de 217 porcos selvagens processados para consumo humano na Austrália, Eglezos et al. (2008) relataram 19,4% de prevalência de *E. coli* e 1,38% de *Salmonella* nas amostras. Hayashidani et al. (2002) estudando as fezes de 131 porcos ferais, mortos para alimentação no Japão, quanto à presença de *Yersinia* e *Listeria*, encontraram *Yersinia* em 49 animais e *Listeria* em apenas 2 animais.

Todos os trabalhos disponíveis sobre porcos selvagens pesquisam bactérias específicas nesses animais, sendo o presente trabalho o único que descreve as bactérias que colonizam naturalmente cavidades desses animais.

5.2 Produção de enterotoxinas estafilocócicas

Nenhum dos *Staphylococcus* isolados de porco monteiro do Pantanal foi positivo para a produção de enterotoxinas (SEA – SED) pelo teste de ELISA.

Não existem estudos disponíveis de *Staphylococcus* enterotoxigênico colonizando porcos selvagens e domésticos, porém estudos realizados em carne de porco mostraram 34,6% de *Staphylococcus aureus* com capacidade para produzir uma ou mais enterotoxina, utilizando a técnica de aglutinação em látex (SET-RPLA) (ATANASSOVA et al., 2001). Analizando *S. aureus* em carcaças de porcos em

abatedouros, Nitzsche et al. (2007) detectaram através da técnica de PCR, genes para enterotoxinas em 51% dos isolados no abatedouro A e em 14% no abatedouro B. Entre os isolados 63%, 31%, 4% e 2% foram positivos para *seg/sei*, *seg*, *sei* e *sec*, respectivamente (NITZSCHE et al., 2007).

A ausência de *Staphylococcus* enterotoxigênico nos porcos selvagens do Pantanal pode indicar um baixo fator de risco para os animais e humanos que estão em contato com esses animais durante a caça, e que se alimentam deles, visto que é costume entre os pantaneiros caçar o porco monteiro e matar o animal ainda no campo. As vísceras dos animais são retiradas e dadas aos cães que ajudam na caça.

5.3 Resistência aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade das enterobactérias isoladas do porco monteiro encontra-se na tabela 3. *Serratia marcescens* teve um alto nível de resistência aos β -lactâmicos cefalotina (98%), amoxicilina+ácido clavulânico (70%) e ampicilina (63%) e alta susceptibilidade aos antimicrobianos não β -lactâmicos cotrimoxazol (100%), gentamicina (99%), ciprofloxacino (95%) e tobramicina (92%).

Enterobacter spp. também apresentou resistência aos β -lactâmicos cefalotina (27%), amoxicilina+ácido clavulânico (21%) e ampicilina (18%), porém foi menos resistente que *S. marcescens*. As drogas mais efetivas contra essa espécie foram tetraciclina, gentamicina (97% ambas), tobramicina (94%) e cotrimoxazol (88%).

Observando a tabela 3 vê-se que resistência a amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina e cefalotina foi o mais comum tipo de resistência observada entre as enterobactérias, que em geral foram bem susceptíveis aos outros antimicrobianos testados. *Serratia marcescens* foi a espécie de enterobactérias que mostrou maior porcentagem de resistência associada a esses antimicrobianos.

Os isolados de *E. coli* apresentaram resistência frente a amoxicilina+ácido clavulânico, cefalotina e enrofloxacino. Contrastando esse achado, Schierack et al. (2009) estudando 42 cepas de *E. coli* isoladas de secções intestinais de 21 porcos selvagens na Alemanha, verificaram que todas as cepas foram sensíveis a amoxicilina+ácido clavulânico, cefalotina, enrofloxacino e também a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina e cotrimoxazol.

Tabela 2: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de 154 enterobactérias isoladas de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.

	<i>S. marcescens</i> (n=87)			<i>Enterobacter</i> spp (n=33)			<i>Cedecea</i> (n=11)			outras (n=18)			<i>E. coli</i> (n=5)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMC	70	14	16	21	6	73	27	0	73	11	6	83	20	20	60
AMP	63	14	23	18	21	61	27	0	73	11	11	78	0	0	100
CFL	98	0	2	27	15	58	36	9	55	22	17	61	40	40	20
CFO	3	14	83	15	12	73	9	9	82	0	6	94	0	0	100
CIP	0	5	95	3	12	85	0	9	91	0	0	100	0	20	80
CLO	2	11	86	3	18	79	0	9	91	0	6	94	0	20	80
ENO	2	16	82	3	24	73	0	9	91	0	6	94	40	0	60
GEN	1	0	99	3	0	97	0	0	100	6	11	83	0	40	60
SUT	0	0	100	0	12	88	0	0	100	6	6	89	0	0	100
TET	55	30	15	3	0	97	9	0	91	6	6	89	0	0	100
TOB	3	5	92	6	0	94	0	9	91	6	6	89	0	0	100

R= resistente; I= intermediário; S= sensível; **AMC**= amoxicilina + ácido clavulânico; **AMP**= ampicilina; **CFL**= cefalotina; **CFO**= cefoxitina; **CIP**= ciprofloxacino; **CLO**= cloranfenicol; **ENO**= enrofloxacino; **GEN**= gentamicina; **SUT**= cotrimoxazol; **TET**= tetraciclina; **TOB**= tobramicina.

Na República Tcheca, de 290 *E.coli* isoladas da cavidade anal de porcos selvagens, apenas 17 apresentaram resistência a ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, estreptomicina, sulfonamidas, cotrimoxazol e tetraciclina (LITERAK et al, 2009).

Schierack et al. (2009) comparando as concentrações inibitórias mínimas (MICs) de *E. coli* isoladas de porcos selvagens e *E. coli* susceptíveis isoladas de seções intestinais de porcos domésticos saudáveis, verificaram que as cepas de porcos selvagens são mais sensíveis que as isoladas de porcos domésticos frente a alguns antibióticos.

P. aeruginosa mostrou 100% de resistência frente a ampicilina, cefalotina e ceftioxina e 100% de susceptibilidade a ciprofloxacino, gentamicina e tobramicina.

Tabela 3: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de bastonetes Gram-negativos não Enterobacteriaceae isolados de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.

	<i>P. aeruginosa</i> (n=6)			*bnete G-/ox+ (n=50)			<i>Aeromonas</i> (n=2)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMC	83	0	17	80	6	14	50	0	50
AMP	100	0	0	82	4	14	50	50	0
CFL	100	0	0	82	2	16	100	0	0
CFO	100	0	0	36	20	44	50	50	0
CIP	0	0	100	0	0	100	0	0	100
CLO	33	33	33	4	12	84	0	0	100
ENO	0	33	67	0	4	96	0	0	100
GEN	0	0	100	0	0	100	0	0	100
SUT	67	17	17	6	8	86	0	0	100
TET	50	33	17	8	16	76	0	0	100
TOB	0	0	100	0	4	96	0	0	100

*bnete G-/ox+: bastonetes Gram-negativos oxidase-positivos

R= resistente; **I**= intermediário; **S**= sensível; **AMC**= amoxicilina + ácido clavulânico; **AMP**= ampicilina; **CFL**= cefalotina; **CFO**= ceftioxina; **CIP**= ciprofloxacino; **CLO**= cloranfenicol; **ENO**= enrofloxacinol; **GEN**= gentamicina; **SUT**= cotrimoxazol; **TET**= tetraciclina; **TOB**= tobramicina.

Seguindo o perfil de resistência apresentado pelas enterobactérias, os bastonetes Gram-negativos não enterobactérias mostraram maior frequência de resistência frente às drogas AMC, AMP, CFL e CFO.

Estudos demonstram que bactérias comensais podem atuar como reservatório de genes de resistência e transferi-los a bactérias patogênicas (BLAKE et al., 2003a). Essa transferência de DNA pode ocorrer intra ou inter espécie bacteriana, entre leveduras, plantas e células de mamíferos (BLAKE et al., 2003b).

Os dados observados com os 59 isolados de *Enterococcus* no presente estudo, mostraram alta susceptibilidade à vancomicina (100%), amoxicilina (90%) e ampicilina (83%) e resistência a oxacilina (98%), cefoxitina (95%) e clindamicina (80%) (tabela 5).

No trabalho de Poeta et al. (2007a), na avaliação de resistência de *Enterococcus* isolados de porcos ferais frente a 11 drogas antimicrobianas, foi observada maior resistência frente às drogas eritromicina (48,5%), tetraciclina (44,8%) e ciprofloxacino (17,9%) e menor resistência frente à gentamicina, vancomicina, teicoplanina (0% ambas) e ampicilina (3,7%). Quando comparado com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se notar que os isolados de *Enterococcus* dos porcos selvagem do Pantanal foram mais resistentes a gentamicina (47%) e ampicilina (17%) que os isolados de Portugal (0% e 3% respectivamente), porém os isolados de Portugal foram mais resistentes a eritromicina (48,5%) e tetraciclina (44,8%) que os do Pantanal (12% e 15% respectivamente).

Nenhum dos *Enterococcus* isolados dos porcos selvagens no presente estudo apresentou resistência aos glicopeptídeos e o mesmo ocorreu com *Enterococcus* isolados de porcos selvagens de Portugal (POETA et al. 2007a), porém esses mesmos pesquisadores isolaram *Enterococcus VanA* quando cultivaram amostras fecais em ágar suplementado com vancomicina (POETA et al. 2007b). Este fato pode indicar que *Enterococcus* resistentes a vancomicina podem estar presentes nas fezes de animais selvagens, mas em baixas proporções, e podem não ser detectados quando o isolamento padrão é realizado.

Tabela 4: Resultado (em porcentagem) de antibiograma de cocos Gram-positivos isolados de porco monteiro da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense.

	<i>Staphylococcus</i> (n=22)			<i>Enterococcus</i> (n=59)			<i>Kocuria</i> (n=4)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMO	9	0	91	10	0	90	25	0	75
AMP	18	0	82	17	0	83	0	0	100
CFL	0	0	100	36	31	34	0	0	100
CFO	9	0	91	95	0	5	25	0	75
CLI	14	14	73	80	2	19	0	0	100
ERI	5	18	77	12	49	39	25	0	75
GEN	0	0	100	47	25	27	0	0	100
OXA	9	0	91	98	0	2	0	0	100
PEN	9	0	91	27	0	73	25	0	75
SUT	5	5	91	49	10	41	50	0	50
TET	0	0	100	15	10	75	0	0	100
VAN	0	0	100	0	0	100	0	0	100

R= resistente; I= intermediário; S= sensível; **AMO**= amoxicilina; **AMP**= ampicilina; **CFL**= cefalotina; **CFO**= ceftioxina; **CLI**= clindamicina; **ERI**= eritromicina; **GEN**= gentamicina; **OXA**= oxacilina; **PEN**= penicilina; **SUT**= cotrimoxazol; **TET**= tetraciclina; **VAN**= vancomicina.

Verificou-se que os *Staphylococcus* apresentaram maior susceptibilidade aos antimicrobianos testados, mostrando maior resistência a ampicilina (18%) e clindamicina (14%) e 100% de susceptibilidade a cefalotina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina e 91% a amoxicilina, ceftioxina, oxacilina, penicilina e cotrimoxazol. Dois isolados de *Staphylococcus* (9%) foram resistentes a oxacilina.

Aerococcus viridans foi sensível a todos os antibióticos testados, exceto a oxacilina, o qual apresentou resistência.

Limitadas informações estão disponíveis sobre a presença de bactérias resistentes a drogas em porcos selvagens. É de esperar que animais selvagens que não estão em contato com agentes antimicrobianos apresentem baixa ou nenhuma resistência a esses agentes. Porém, em um ambiente tão dinâmico como o

Pantanal, onde a fauna é muito diversa e a pecuária de corte é grande, há uma ampla interação entre animais ferais, domésticos e humanos, criando uma oportunidade adequada para transmissão de bactérias, e provavelmente genes de resistência são transferidos entre a microbiota dos animais, humanos e bactérias ambientais (figura 6).

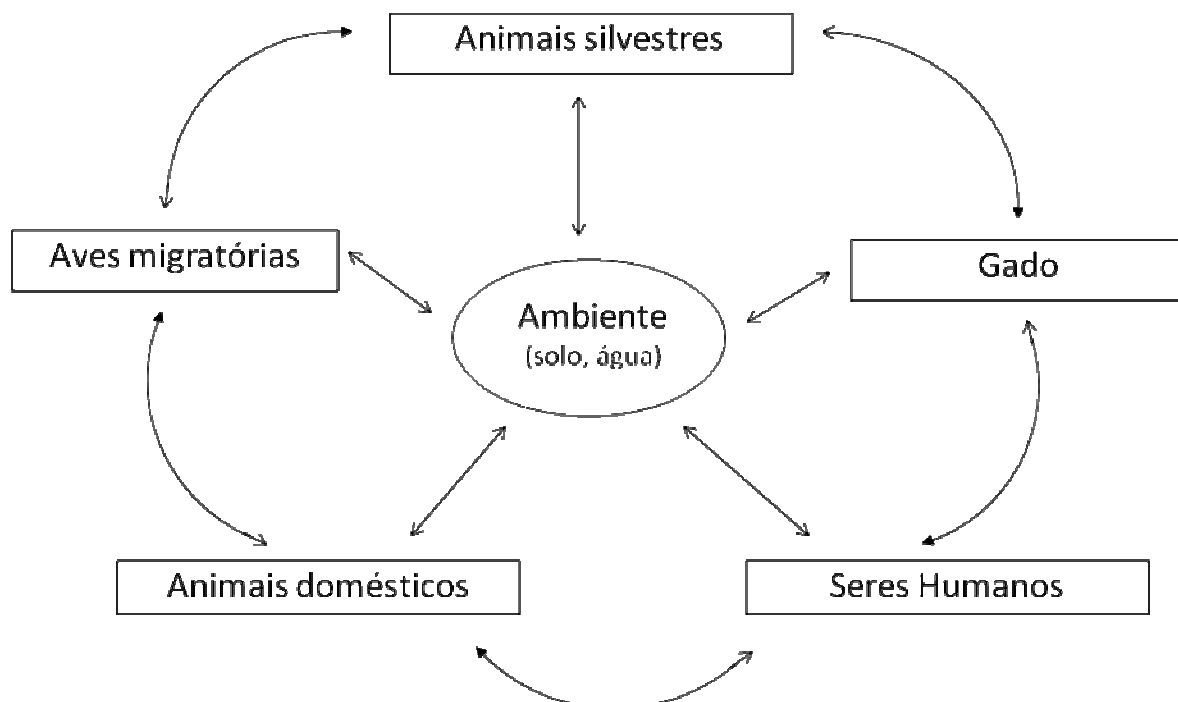


Figura 6: Possíveis fontes de disseminação bacteriana no Pantanal.

A resistência bacteriana é um fenômeno que ocorre em todo o mundo, e é facilmente adquirida com o uso constante e inapropriado de drogas terapêuticas em humanos e animais, ou pelo contato com quem já possua essas cepas resistentes.

No Pantanal, é fato que criações domésticas vivem soltas e no período diurno transitam livremente pela mata, podendo compartilhar o mesmo ambiente e ter contato com o porco monteiro. Além disso, é uma prática entre os fazendeiros locais o cruzamento entre porcas domésticas, de raças definidas, com os machos selvagens para fins de adaptação destas raças domésticas ao ambiente pantaneiro e para ganho de rusticidade. O homem e animais, como cães e eqüinos, têm contato com o porco monteiro durante a caça tradicional, e a extensiva criação de bovinos pasta livre pelo Pantanal, em estreito contato com a fauna selvagem, possibilitando a transferência de microrganismos resistentes entre eles.

Somado a isso, existe o fato do Pantanal ser um berço de aves migratórias, que temporariamente dividem o ambiente com porco monteiro, gado e animais selvagens locais. Essas aves percorrem grandes distâncias e habitam uma variedade de ambientes. Provavelmente adquirem bactérias resistentes a antimicrobianos em ambientes sobre influência humana ou de outras aves que estiveram em contato com esses ambientes. Aves migratórias podem ser consideradas importantes reservatórios e vetores de disseminação de bactérias resistentes para o ecossistema (NUNES & TOMAS, 2008; ALLEN et al., 2010).

Pouco se sabe sobre o uso de antimicrobianos no Pantanal, e estudos adicionais precisam ser realizados para uma direção mais precisa da fonte de resistência bacteriana em porcos selvagens no Pantanal Sul-Matogrossense.

6. CONCLUSÕES

De acordo com as bactérias isoladas, a microbiota que coloniza os porcos selvagens da sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal utilizados neste estudo, é composta de bactérias ambientais e ubíquas, e bactérias que comumente colonizam mamíferos.

Serratia marcescens foi a bactéria mais frequente, isolada de todos os animais estudados e presente em todas as cavidades, seguida pelos *Enterococcus*, que colonizaram 82% dos animais estudados.

As regiões da orelha esquerda e direita, nariz e boca dos animais estudados estavam mais colonizadas por *Serratia marcescens*, enquanto as regiões do reto, vagina ou prepúcio tinham o predomínio de *Enterococcus* spp. colonizando.

Bactérias sabidamente patogênicas não foram isoladas desses animais, e as cepas de *Staphylococcus* isoladas não são produtoras de enterotoxinas.

As bactérias gram-negativas foram mais resistentes aos antimicrobianos amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina e cefalotina, e em geral foram bem susceptíveis aos outros antimicrobianos testados.

Os *Enterococcus* mostraram alta susceptibilidade à vancomicina, amoxicilina e ampicilina, enquanto os *Staphylococcus* foram mais sensíveis às drogas testadas.

**CAPÍTULO II: ANÁLISE MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS BACTERIANOS DE PORCO
MONTEIRO DO PANTANAL.**

3. OBJETIVOS

Avaliar a presença de genes para fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de porco monteiro (*Sus scrofa*) do Pantanal sul-matogrossense;

Pesquisar a presença de genes que conferem resistência a vancomicina nos isolados de *Enterococcus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *Enterococcus* spp. (n=26) e *E. coli* (n=5) isolados do porco monteiro foram submetidos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificação da presença de genes específicos de patogenicidade e de resistência a drogas. Cepas de *Enterococcus* spp. (n=6) e *E. coli* (n=36) isoladas de porco selvagem do Pantanal na sub-região da Nhecolândia em 2006, por Rita de Cássia da Silva Paes, também foram analisadas.

Nos isolados de *E. coli* foi realizado PCR para a detecção dos genes de virulência típicos de *E. coli* patogênica, tais como *eae* (codifica para intimina, que medeia a aderência de EPEC e EHEC às células epiteliais), *espA* e *espB* (codificam as proteínas EspA e EspB, respectivamente, que são essenciais para a transdução de sinal nas células epiteliais e formação de lesão Adhesion/Evasion) (NATARO & KAPER, 1998).

A presença de gene de resistência a vancomicina (*vanB*) foi pesquisada nos isolados de *Enterococcus* que mostraram reduzida susceptibilidade ou resistência a esse antimicrobiano, quando testados pelo método convencional de disco por difusão em ágar Mueller Hinton.

4.1 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores utilizados na reação de PCR foram desenhados utilizando o site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os programas Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW, Oligo Perfect da Invitrogen e Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Um dos pares dos iniciadores foi marcado com um fluorocromo FAM, PET, VIC ou NED, que emitem cores azul, vermelho, verde e amarelo, respectivamente (tabela 6).

Tabela 5: Iniciadores para estudos moleculares com *Escherichia coli* e *Enterococcus*.

	Gene alvo	Seqüências dos Iniciadores (5'– 3')	Tamanho Amplicon (pb)	Fluorocromo
<i>Escherichia coli</i>	eae	TAATCGATCCCCATCGTCAC CAAATTTAGGTGCGGGTCAG	403	FAM
	EspA	TGTCATTGCGAGGATCATTT AGGCAGTATGTGCGAAAGACGA	281	FAM
	EspB	CCGATTGACCCATACGATTC TGCCAACAACGGTATCTGAA	207	VIC
	16SrDNA	AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT ATTCCGATTAACGCTTGAC	147	PET
<i>Enterococcus</i>	vanB	AACGGTGTATGGAAGCTATGC CGGGAAAGCCACATCAATAC	150	PET
	16SrDNA	CGGAAACCCTCCAACACTTA CCATGTGTAGCGGTGAAATG	168	FAM

4.2 Extração de DNA bacteriano

Para a investigação molecular, no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, cada espécie bacteriana identificada foi cultivada em meio líquido BHI (Acumedia, EUA) a 37°C *overnight*. O DNA cromossômico foi extraído utilizando kit de extração illustra blood genomicPrep Mini Spin (GE healthcare, Reino Unido) seguindo as instruções do fabricante (vide anexo A). Para confirmação da extração, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (5µg/100mL). Foram aplicados no gel o marcador λHind III (Invitrogen) e as amostras, utilizando-se 1 µL de DNA para 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 80 volts por aproximadamente 60 minutos, e as bandas formadas analisadas em transluminador sob luz UV.

4.3 Quantificação de DNA extraído

Para estimar a concentração de DNA (MOORE et al., 1997), cada amostra extraída foi diluída (5:45) em H₂O ultrapura estéril e submetida a agitação em vortex para homogeneização da solução. Cinquenta microlitros dessa solução foi transferida para cubeta de quartzo e submetida à leitura da densidade óptica a 260 nm (DO260), para avaliar a quantidade de DNA, e a 280 nm (DO280) para estimar a contaminação com proteínas, em um espectrofotômetro. O quociente entre DO260 e DO280 deve situar-se entre 1,5 e 2,0 para se considerar que está perante uma amostra de DNA com pureza adequada para análise posterior. Um valor inferior indica contaminação com proteínas e um valor superior indica contaminação com RNA. A concentração de DNA total foi estimada, de acordo com a equação abaixo, tendo em conta que uma unidade de DO corresponde à concentração de 0,050 µg/µl de DNA de dupla cadeia (dsDNA) (MOORE et al., 1997).

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{DO260} \times 0,05 \times \text{fator diluição}$$

4.4 Amplificação do DNA

No Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM) – Hospital Escola Álvaro Alvim, o DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação dos genes pela técnica da PCR quantitativa fluorescente (QF-PCR).

O tampão de reação para a amplificação foi preparado conforme o protocolo descrito na tabela 7.

Tabela 6: Protocolo para preparo do tampão de reação para PCR.

Reagentes	Volume por amostra (µl)
Solução de PCR mix ^a	5,25
Pares de iniciadores (10pmol)	2,75
Taq polimerase (AmpliTaq Gold)	0,25
Volume total	8,25

^a Constituintes do PCR mix (2,0mM MgCl₂): 127µl solução de dNPTs (1,25mM), 62,5µl PCR buffer 10X, 63,5µl MgCl₂ (25mM) e 59,5µl água milli-Q estéril.

Uma alíquota de 5µl de DNA foi adicionada a 7,5µl do tampão de reação acima e submetida às condições de amplificação no termociclador, conforme mostra a figura 7.

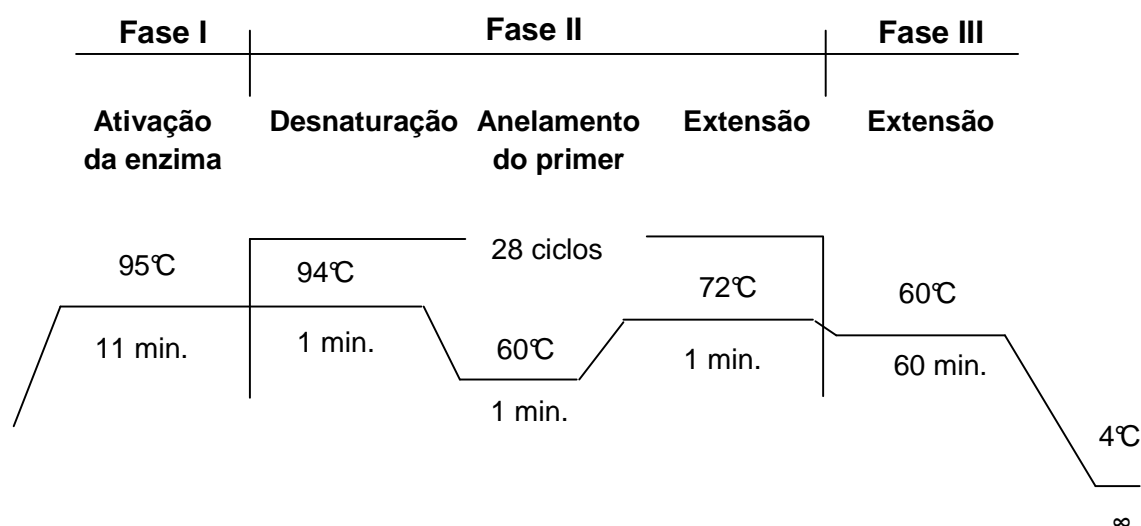


Figura 7: Esquema demonstrando as condições de amplificação pela técnica de PCR.

Anterior aos ensaios de detecção de genes específicos, cada amostra de DNA extraído de *E. coli* e *Enterococcus* foi submetida a PCR com iniciadores 16SrDNA específicos para cada espécie, com o objetivo de confirmar a presença de DNA bacteriano.

Os isolados de *E. coli* foram testados para a pesquisa dos genes *eae*, *espA* e *espB* que codificam para fatores de virulência, e os isolados de *Enterococcus* foram testados para a pesquisa do gene *vanB* que codifica resistência a vancomicina, através da reação de PCR monoplex.

Nos ensaios de cada par de iniciadores foi utilizado um controle negativo, onde foi adicionada água no lugar do DNA, e como controle positivo foi utilizado DNA de EHEC EDL931 (cedida pela Dr. Kátia Regina Silva Aranda da UNIFESP) para os iniciadores de *eae*, DNA de *E. coli* isolada de avestruz (cepa M26) para iniciadores de *espA* e *espB*, e DNA de *Enterococcus faecalis* *vanB* (cedida pelo prof. Dr. Francisco Ernesto Moreno Bernal da UNB).

4.5 Eletroforese capilar

Ao produto amplificado foram adicionados formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, EUA) e o marcador molecular GeneScan LIZ 500 (Applied Biosystems, EUA). Essa mistura foi submetida à corrida eletroforética capilar com polímero POP4 (Applied Biosystems) em analisador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, EUA). Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa GeneScan e Genotyper (Applied Biosystems, EUA).

O analisador genético ABI PRISM 310 é um sistema de eletroforese capilar acoplado a um laser e conectado a um computador. A eletroforese se realiza através de um polímero presente em um capilar. Este capilar está acoplado a um laser, de modo que quando os fragmentos separados ao longo do capilar são excitados pelo laser, emitem um sinal fluorescente devido ao fluorocromo com que estão marcados, e este sinal é registrado no computador. Com um software específico (GeneScan Analysis - Applied Biosystems) os sinais são transformados em um gráfico de picos (eletroferograma), em que cada pico corresponde a um sinal fluorescente, isto é, a um fragmento de DNA (AVILA, 2003).

Um esquema com interpretação do eletroferograma pode ser observado na figura 8.

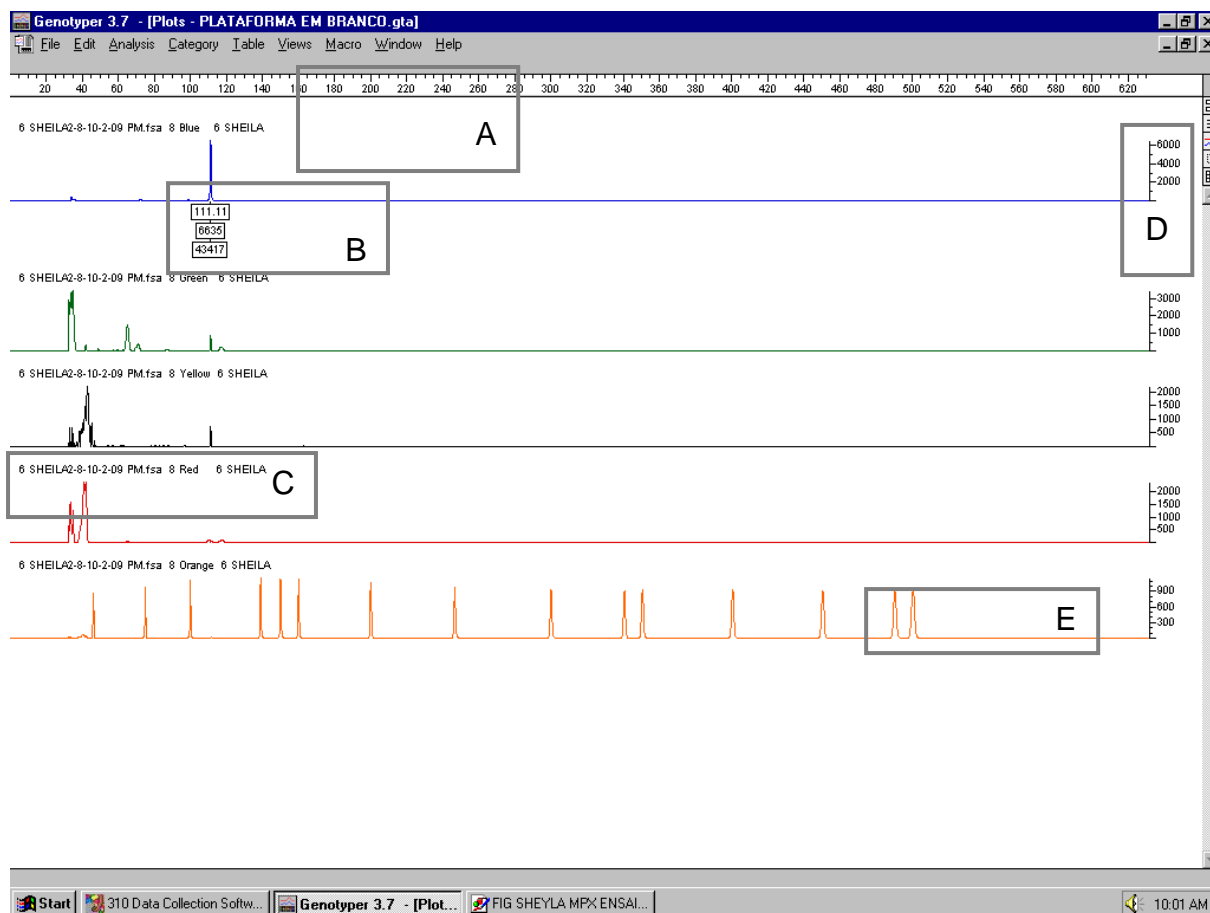


Figura 8: Esquema de interpretação do eletroferograma

A: número de pares de nucleotídeos. **B:** caracterização dos alelos em pares de nucleotídeos, atividade de fluorescência e proporção alélica em área. **C:** identificação da amostra. **D:** atividade de fluorescência em unidades arbitrárias. A intensidade da fluorescência está diretamente relacionada à quantidade de DNA amplificado. **E:** marcador LIZ 500 com os picos padrões (ALVES DA SILVA, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação de genes de virulência em *Escherichia coli*

O resultado da PCR realizada em amostras de DNA de *E.coli* está demonstrado nos eletroferogramas das figuras 9 e 10.

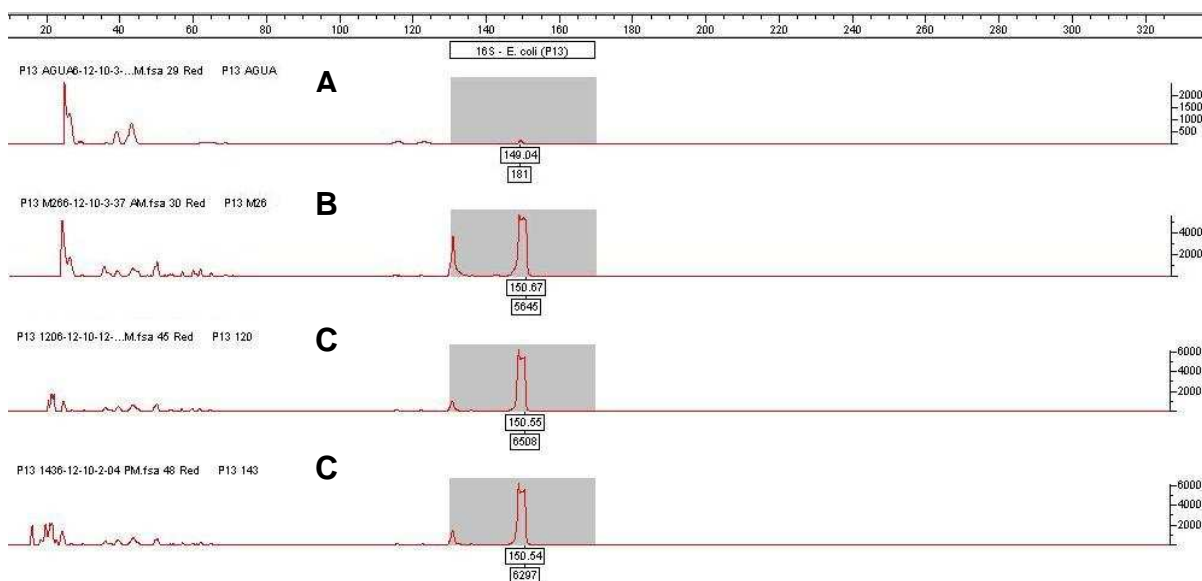


Figura 9: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa do gene 16SrDNA em *E. coli* isolados de porcos selvagens do Pantanal.

A: controle negativo, **B:** controle positivo, e **C:** amostra isolada de porco selvagem do Pantanal.

Todos os isolados identificados como *E. coli* pelos testes bioquímicos amplificaram o gene 16SrDNA, específico para *E. coli*, e foram subsequentemente testados quanto a presença dos genes *eae*, *espA* e *espB*.

Nas cepas de *E. coli* isoladas de porcos selvagens do Pantanal, não foi detectada a presença dos genes de virulência *eae*, *espA* e *espB*.

Em contraste com esses resultados, a presença de genes de virulência em *E. coli* tem sido mostrada em porcos selvagens em outros países. Schierack et al. (2009) detectaram genes de virulência (*est-II*, *eltB-lp*, *paa*, *aida-I*, e *astA*) em *E. coli* isoladas de porcos selvagens na Alemanha. Sanchez et al. (2010) detectaram os genes *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *eae* e *saa*, em respectivamente, 4, 12, 13, 8 e 1 cepas de *E. coli* isoladas de porcos selvagens na Espanha. Jay et al. (2007) mostraram a presença dos genes *eaeA*, *hlyA*, e *stx2* em 13,4% das cepas de *E.coli* isoladas de porcos selvagens dos Estados Unidos.

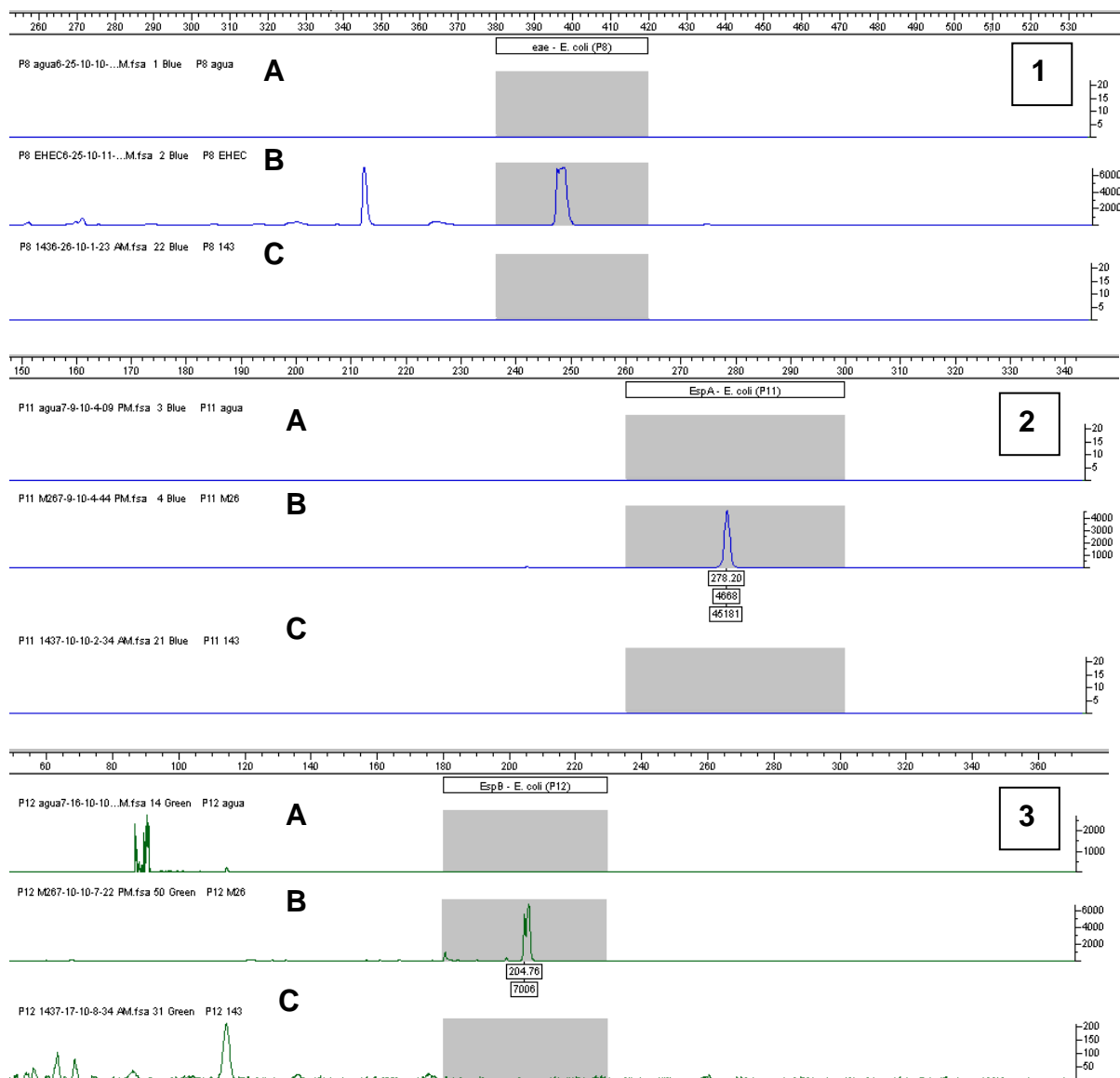


Figura 10: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa dos genes *eae* (1), *espA* (2) e *espB* (3) em *E. coli* isolados de porcos selvagens do Pantanal

A: controle negativo, **B:** controle positivo, e **C:** uma amostra isolada de porco selvagem do Pantanal.

Cada um desses trabalhos estudou diferentes genes associados a virulência de *E. coli*. As cepas patogênicas dessa bactéria carregam genes de virulência associados a patótipos específicos e cepas comensais raramente possuem esses genes. Os genes de virulência testados no presente trabalho, com *E. coli* isoladas de porcos selvagens do Pantanal, são genes associados aos patótipos EPEC e EHEC. Com os resultados encontrados, pode-se inferir que as cepas isoladas colonizando esses animais não são EPEC e EHEC.

Estudos adicionais precisam ser realizados com genes de virulência

associados aos outros patótipos para uma verificação mais consistente da ausência de *E. coli* patogênica nos porcos selvagens do Pantanal.

5.2 Amplificação de genes de resistência em *Enterococcus*

Na figura 11 estão representados os resultados da PCR realizada em amostras de DNA de *Enterococcus*.

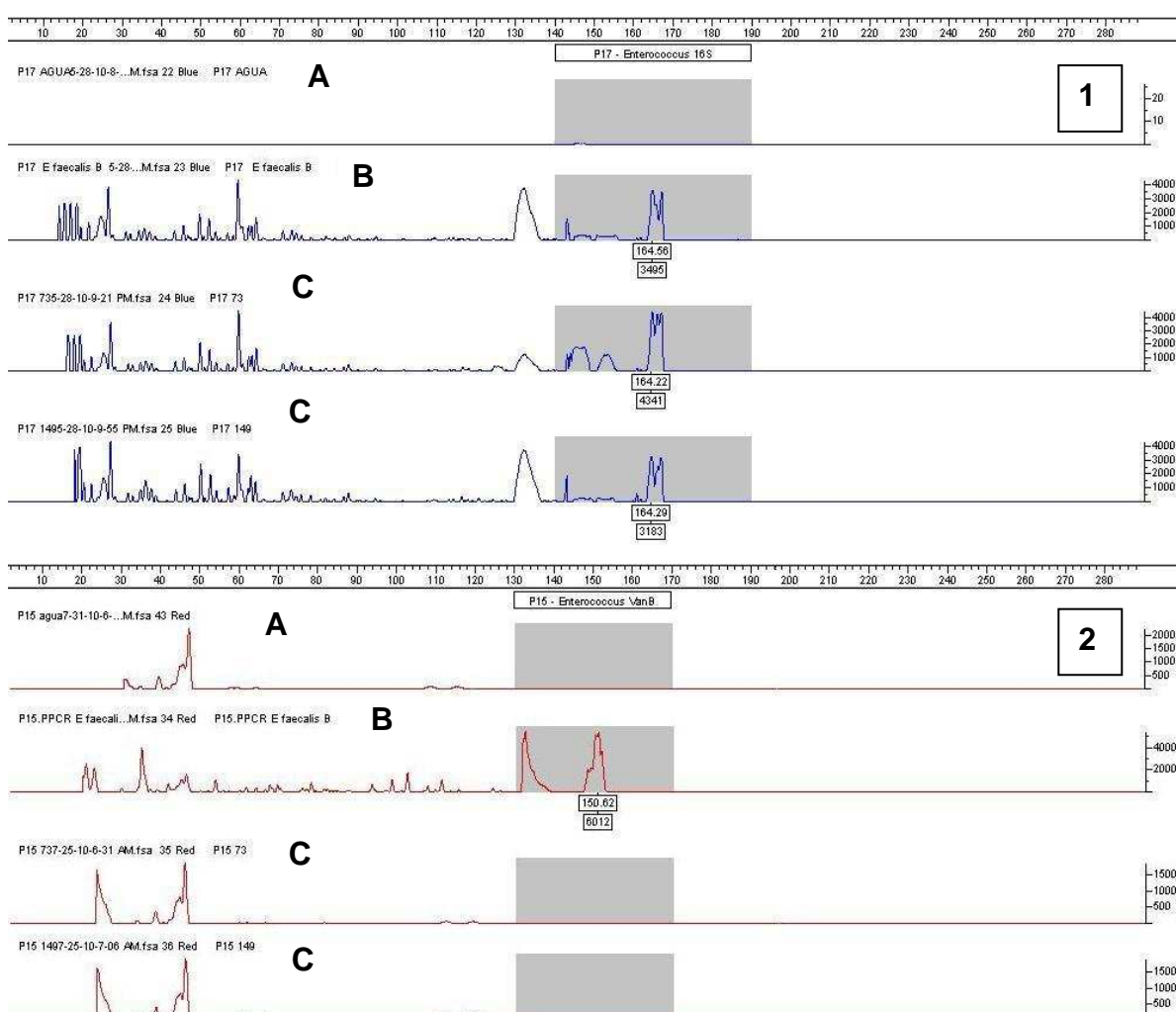


Figura 11: Eletroferograma dos produtos de PCR para pesquisa dos genes 16SrDNA (1) e *vanB* (2) em *Enterococcus* isolados de porcos selvagens do Pantanal.

A: controle negativo, B: controle positivo, e C: amostra isolada de porco selvagem do Pantanal.

As cepas isoladas dos porcos selvagens e identificadas pelos testes bioquímicos como *Enterococcus* foram todas positivas para a presença do gene

16SrDNA, específico para *Enterococcus*.

A presença do gene *vanB*, que confere resistência a vancomicina, não foi detectada nos *Enterococcus* isolados de porcos selvagens do Pantanal.

Os principais genes que conferem resistência a vancomicina são os genes *vanA*, *vanB*, e *vanC*. Os genes *vanA* conferem alta resistência a vancomicina e os genes *vanB*, resistência intermediária a essa droga. Ambos são transferíveis e induzíveis, ou seja, resulta na indução da síntese de proteínas que juntas conferem resistência. O gene *vanC* confere baixa resistência a vancomicina e são específicos para *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. São genes de resistência intrínseca e intransferíveis (GOLD, 2001). Por razões de controle e epidemiologia faz-se necessário a diferenciação entre os genes *vanA*, *vanB* e *vanC*.

Gene de resistência a vancomicina em porcos selvagens foi detectado pela primeira vez em animais de Portugal, onde 3% dos isolados de *Enterococcus* eram carreadores do gene *vanA*, e nenhum isolado foi positivo para os genes *vanB*, *vanC1*, *vanC2* e *vanD* (POETA et al., 2007b). Anterior a esse trabalho, somente mais dois estudos mostram a ocorrência de genes de resistência a vancomicina em animais silvestres, os quais foram reportados em veados na Eslováquia (LAUKOVÁ, 1999) e em pequenos mamíferos na Inglaterra (MALLON et al., 2002).

Em porcos domésticos vários estudos mostram a presença de genes de resistência a vancomicina. Um estudo realizado com *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de porcos domésticos na Dinamarca, mostrou que 17% dos isolados eram resistentes a vancomicina, e todos possuíam gene *vanA* (AARESTRUP et al., 2000). No Japão, entre 40 *Enterococcus* isolados de suínos dois possuíam o gene *vanB* (SAKAI et al., 2003). Na Coreia, enterococcus resistentes a vancomicina eram carreadores do gene *vanC* (SEO et al., 2005).

Os *Enterococcus* isolados de porcos selvagens do Pantanal, no presente trabalho, mostraram sensibilidade a vancomicina quando testados pela técnica de disco por difusão em ágar. Porém, não significa que não possam albergar genes de resistência a tal droga, pois os genes podem estar silenciados no genoma bacteriano e serem ativados quando em presença da droga. Estudos utilizando outros genes que conferem resistência à vancomicina precisam ser conduzidos para obter resultados mais consistentes sobre a ocorrência desses genes em enterococos de porcos selvagens no Pantanal.

6. CONCLUSÕES

Cepas de *E. coli* que colonizam porcos selvagens do Pantanal não foram positivas para a presença de genes de virulência associados a EPEC e EHEC.

Não foi detectada a presença do gene *vanB*, que confere resistência a vancomicina, em isolados de *Enterococcus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* v.37, p.127–137, 2000.
- ABDON, M.M.; POTT, V.J.; SILVA, J.S.V. Avaliação da cobertura por plantas aquáticas em lagoas da sub-região da Nhecolândia no Pantanal por meio de dados landsat e spot. *Pesq. agropec. Bras.*, v. 33, Número Especial, p.1675-1681, 1998.
- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.*, v.7, p.410–413, 1999.
- ALHO, C.J.R.; LACHER, T.E.J.; CAMPOS, Z.M.S.; GONÇALVES, H.C. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: levantamento preliminar de espécies. *Rev. Bras. Biol.*, v. 48, n. 2, p. 213-25, 1988.
- ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Matogrossense. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, (Documento, 8),1987, 339p.
- 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. *Nature Reviews*, v.8, p.251-259, 2010.
- ALVES DA SILVA, A.F. Recombinação em 21q dificulta a determinação da origem meiótica da não disjunção em portadores da síndrome de Down. Monografia de conclusão de curso (ciências biológicas) Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 63p.
- ANGULO, F.J.; BAKER, N.L.; OLSEN, S.J.; ANDERSON, A.; BARRETT, T.J. Antimicrobial Use in Agriculture: Controlling the Transfer of Antimicrobial Resistance to Humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v.15, n.2, p.78-85, 2004.
- ARCHER, G.L. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, v.26, p.1179-1181, 1998.
- ARMAND-LEFEVRE, A.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and

- pigs. *Emm Inf Dis*, v.11, n. 5, p.711-714, 2005.
- ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p.105–113, 2001.
- ÁVILA, A.I.F. Estudio de la base genética del color de la capa y aplicaciones prácticas en porcino. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2003. 255 p.
- BANCROFT, E.A. Antimicrobial resistance. Its not just for hospitals. *JAMA*, v.298, n.15, p.1803-1804, 2007.
- BATES, J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J Hosp Infect*, v.7, n.2, p.89-101, 1997.
- BAUMS, C.G.; VERKÜHLEN, G.J.; REHM, T.; SILVA, L.M.G.; BEYERBACH, M.; POHLMAYER, K.; VALENTIN-WEIGAND, P. Prevalence of *Streptococcus suis* Genotypes in Wild Boars of Northwestern Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, p.711–717, 2007.
- BENNETT, R.W. Staphylococcal Enterotoxins: Micro-slide Double Diffusion and ELISA-based Methods. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*. U.S. Food & Drug Administration, 2001.
- BERGDOLL, M.S.; SCHLIEVERT, P.M. Toxic shock syndrome toxin. *Lancet* ii, 691, 1984.
- BLAKE, D.P.; HILLMAN, K.; FENLON, D.R.; LOW, J.C. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 428–436, 2003b.
- BLAKE, D.P.; HUMPHRY, R.W.; SCOTT, K.P.; HILLMAN, K.; FENLON, D.R.; LOW, J.C. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J. Appl. Microbiol.*, v. 94, p. 1087–1097, 2003a.
- BLANCO, LEMUS, G.J.A.; GRANDE, J.; GANGOSO, L.; GRANDE, J.M.; DONAZAR, J.A.; ARROYO, B.; FRIAS, O.; HIRALDO, F. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ. Microbiol.*, v. 9, p.1738–

1749, 2007.

- BRASIL, Lei Federal n.º 5.197, de 03 de janeiro de 1967 – Código de Proteção à Fauna. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/siucweb/unidades/legislacao/coletanea/ lei5197.htm](http://www.ibama.gov.br/siucweb/unidades/legislacao/coletanea/lei5197.htm)> Acesso em: 23 set. 2007.
- BRUM, P.A.R.; SOUZA, J.C. Níveis de nutrientes minerais em lagoas (“baías” e “salinas”) no Pantanal sul-mato-grossense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, n.12, p.1451-1454, 1985.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother*, v.45, p.1374–8, 2001.
- CAMARGO, I.L.B.C.; GILMORE, M.S.; DARINI, A.L.C. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect*, v.12, n.11, p.1123-1130, 2006.
- CAMPOS, Z. M. S. Effect of habitat on survival of eggs and sex ratio of hatchlings of caiman (*Crocodilus yacare*) in the Pantanal , Brazil. *Journal of Herpetology*, v. 27, p. 127-132, 1993.
- CHOQUENOT, D.; MCILROY, J.; KORN, T. *Managing Vertebrate Pests: Feral Pigs*. Bureau of Resource Sciences, Australian Government Publishing Service, Canberra. 1996, 163 p.
- CORNICK, N.A., HELGERSON, A.F. Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157:H7 in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.5331–5335, 2004.
- COURVALIN, P. Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram- Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, v.38, n.7, p.1447-1451, 1994.
- COUTINHO, M.; CAMPOS, Z.; POTT, A. Manejo da fauna e da flora silvestre como alternativa de produção agropecuária e mecanismo de conservação do Pantanal. In: *Tecnologias e informações para a pecuária de corte no Pantanal*, Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP, 1997. 161p.
- DA SILVA, M. C.; AMARAL, V. Fazenda Rio Negro: tradição e conservação no Pantanal Mato-Grossense / Conservação Internacional – Brasil. Campo Grande,

- MS: Ed. UNIDERP, 2007. 116 p.
- DESBIEZ, A. L. J. Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting. 2007. 288 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury.
- DESBIEZ, A.L.J.; SANTOS, S.A.; KEUROGHLIAN, A.; BODMER, R.E. Niche partitioning among white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*), collared peccaries (*Pecari tajacu*), and feral pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Mammalogy*, v. 90, p. 119-128, 2009a.
- DESBIEZ, A.L.J.; KEUROGHLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; BODMER, R.E. Ecologia de populações de porco monteiro no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009b. 44p.
- DESBIEZ, A. L .J.; KEUROGHLIAN, A. Predation of young palms (*Attalea phaterata*) by feral pigs in the Brazilian Pantanal. *Suiform Soundings*, v. 9, p. 35-40, 2009.
- EGLEZOS, S.; STUTTARD, E.; HUANG, B.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. A Survey of the Microbiological Quality of Feral Pig Carcasses Processed for Human Consumption in Queensland, Australia. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.5, n.1, p.105-109, 2008.
- EMBRAPA - CPAP. Plano de utilização da fazenda Nhumirim. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1997. 72p. (EMBRAPA CPAP, Documento, 21). Soriano, B. M. A., de Oliveira, H., Catto, J. B., Comastri Filho, J. A., Galdino, S., de Salis, S. M., organizado.
- EMBRAPA - CPAP. Ecologia do Pantanal. Mato grosso, 2009. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/skel.php?end=paginasec/pantanal.html>> Acesso em: 13 mar. 2009.
- FEDER, I.E., MORGAN WALLACE, F., GRAY, J.T., FRATAMICO, P., FEDORKA-CRAY, P.J., PEARCE, R.A., CALL, J.E., PERRINE, R., LUCHANSKY, J.B. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, p.380–383, 2003.
- FRASER, S.L.; ARNETT, M.; SINAVE, C.P. Enterobacter Infections. *eMedicine Specialties*, Jan. 2010. <http://emedicine.medscape.com/article/216845-overview>
- FREITAS, T.P.T.; PAES, R.C.S.; KEUROGHLIAN, A.; OLIVEIRA, J.M.A.; NOREK, A.; JANSEN, A.M.; HERRERA, H.M. 2004. Ocorrência de microorganismos patogênicos em queixadas, catetos e porcos de vida livre no Pantanal sul-

- matogrossense. In: Simpósio sobre Recursos naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal, 4, Anais. Corumbá.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ, S.; RUBIO, R.; PEREIRA, G.; ALONSO, J.M.; HERMOSO DE MENDOZA, J.; REY, J., Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet. Microbiol.*, v.121, p.373–377, 2007.
- GILL, C.O.; JONES, T. Control of the contamination of pig carcasses by *Escherichia coli* from their mouths. *Intern J Food Microbiol*, v.44, p. 43–48, 1998.
- GIRIO, R.J.S.; PEREIRA, F.L.G.; FILHO, M.M.; MATHIAS, L.A.; HERRERA, R.C.S.P.; ALESSI, A.C.; GIRIO, T.M.S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospiras* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunistoquímica para detecção do agente. *Ciência Rural*, v. 34, n.1, p.165-169, 2004.
- GOLD, H.S. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations, *ANTIMICROBIAL RESISTANCE*, v.33, p.210-219, 2001.
- GRAVES, H. B. Behavior and ecology of wild and feral swine (*Sus scrofa*). *J. Anim Sci.*, Champaign, v. 58, n. 2, p. 482-92, 1984.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*, v.54, n.2, p.321-332, 2004.
- HAMPTON, J.; SPENCER, P.B.S.; ELLIOT, A.D.; THOMPSON, R.C.A. Prevalence of Zoonotic Pathogens from Feral Pigs in Major Public Drinking Water Catchments in Western Australia. *EcoHealth* v.3, p.103–108, 2006.
- HAYASHIDANI, H.; KANZAKI, N.; KANEKO, Y.; OKATANI, A.T.; TANIGUCHI, T.; KANEKO, K.; OGAWA, M. Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in wild boars in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, v.38, n.1, p. 202–205, 2002.
- HEJAZI, A; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol.*, v.46, p.903-912, 1997.
- HERRERA, H.M.; NOREK, A.; FREITAS, T.P.T.; RADEMAKER, V.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol Res*, v.96, p.121–126, 2005.
- HERRERA, R.C.S.P. Hábitos alimentares do porco monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. Monografia de Pós-Graduação

- "Lato Sensu". Universidade Federal do Espírito Santo, 1995. 35 p.
- HUDSON, C.R.; QUIST, C.; LEE, M.D.; KEYES, K.; DODSON, S.V.; MORALES, C.; SANCHEZ, S.; WHITE, D.G.; MAURER, J.J. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in southeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* v.38, p.1860–1865, 2000.
- JAY, M.T.; COOLEY, M.; CARYCHAO, D.; WISCOMB, G.W.; SWEITZER, R.A.; CRAWFORD-MIKSZA, L.; FARRAR, J.A.; LAU, D.K.; O'CONNELL, J.; MILLINGTON, A.; ASMUNDSON, R.V.; ATWILL, E.R.; MANDRELL, R.E. *Escherichia coli* O157:H7 in Feral Swine near Spinach Fields and Cattle, Central California Coast. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 12, p. 1908-1977, 2007.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.2, p.123–140, 2004.
- LITERAK, I.; DOLEJSKA, M.; RADIMERSKY, T.; KLIMES, J.; FRIEDMAN, M.; AARESTRUP, F.M.; 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*, p.1-10, 2009.
- LAUKOVÁ, A. Vancomycin-resistant enterococci isolates from the rumen content of deer. *Microbios* v.97, p.95–101, 1999.
- LOURIVAL, R.F.F. A caça no Pantanal da Nhecolândia-Corumbá-MS. 1993. 103p. Dissertação em Zoologia - Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 1993.
- MALLON, D.J., J.E. CORKILL, S.M. HAZEL, J.S. WILSON, N.P. FRENCH, M. BENNETT, AND C.A. HART. Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild mammals. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.636–638, 2002.
- MARTINS, M.F.; ROSSI-MARTINEZ, N.M.; FERREIRA, A.; BROCHI, M.; YANO, T.; CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA W.D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Vet. Microbiol.* v.76, p.51-59, 2000.
- MAURO, R. Estudos faunísticos na Embrapa Pantanal. *Arch. Zootec.*, v. 51, p. 175-185, 2002.
- MENG, X.J.; LINDSAY, D.S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 364, p.

2697–2707, 2009.

- MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. In: Alouf, J.E., Freer, J.H., *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, London: Academic Press, 1999, cap. 33, p. 589-610.
- MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.62, p.1181–1187, 2008.
- MOURÃO, G.M.; COUTINHO, M.E.; MAURO, R.A.; TOMÁS, W.M.; MAGNUSSON, W. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porco ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22p.il. (Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).
- MULLER, H.E.; BRENNER, D.J.; FANNING, G.R.; GRIMONT, P.A.D.; KÄMPFER, P. Emended Description of *Buttiamella agrestis* with recognition of Six New Species of *Buttiamella* and Two New Species of *Kluyvera*: *Buttiamella ferragutiae* sp. nov., *Buttiamella gaviniae* sp. nov., *Buttiamella brennerae* sp. nov., *Buttiamella izardii* sp. nov., *Buttiamella noackiae* sp. nov., *Buttiamella warmboldiae* sp. nov., *Kluyvera cochleae* sp. nov., and *Kluyvera georgiana* sp. nov. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, v.46, n.1, p.50-63, 1996.
- MURRAY, B.E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.*, v.4, p.37–47, 1998.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*, 4 ed., Missouri: Mosby, 2002, 826 p.
- NATARO J.P.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p. 142-201, 1998.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8 ed., 2003.
- NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. *Veterinary Microbiology*, v.120, p. 292-299, 2007.
- NUNES, A.P.; TOMAS, W.M. Aves migratórias e nômades ocorrentes no Pantanal. – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2008. 124p.
- OSTERBLAD, M.; NORRDAHL, K.; KORPIMAKI, E.; HUOVINEN, P. Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature*, v.409, p.37–38, 2001.

- PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*. v.55, p.555-565, 1992.
- PAES, R.C.S.; RIBEIRO, O.C.; CARNEIRO MONTEIRO, L.A.R.; FIGUEIREDO, A.O.; NETO, A.A.C.; OLIVEIRA, J.M.; DA ROSA, G.O.; KEUROGHLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; HERRERA, H. M. Enfermidades de Ocorrência no Porco Monteiro (*Sus scrofa*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Suiform Soundings*, v.9, n.1, p.29–34, 2009. [http://data.iucn.org/themes/ssc/sqs/pphsg/Suiform%20soundings/Newsletter%209\(1\).pdf](http://data.iucn.org/themes/ssc/sqs/pphsg/Suiform%20soundings/Newsletter%209(1).pdf)
- PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 11, n. 3, p. 450–479, 1998.
- PEDERSEN, K.; PEDERSEN, K.; JENSEN, H.; FINSTER, K.; JENSEN, V.F.; HEUER, O.E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, p. 775-781, 2007.
- POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol*, v. 125, p. 368-374, 2007a.
- POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Characterization of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-Like And Tn916 Tn1545-Like Transposons In Wild Boars (*Sus Scrofa*). *Microbial Drug Resistance*, v.13, n.3, p.151-156, 2007b.
- POKHIL, S.I., Biological Characteristics of the *Rahnella aquatilis* Isolated from Different Regions, *Mikrobiol.Zh.*, v.60, n.3, p.31–38, 1998.
- PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D. (ED.) 2000. Antimicrobial therapy in veterinary epidemiology, 3rd ed. Iowa State University Press, Ames.
- PULLAR, E.M. The wild (feral) pigs of Australia: their origin, distribution and economic importance. *Memoirs of the National Museum Melbourne*, v.18, p.7-23, 1953.
- RODRIGUES, K.L.; MOREIRA, A.N.; ALMEIDA, A.T.S.; CHIOCHETA, D.; RODRIGUES, M.J.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p. 297-299, 2004.

- ROSENKRANZ, M.; ELSNER, H.A.; STURENBURG, H.J.; WEILLER, C.; ROTHER, J.; SOBOTTKA, I. *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *J. Neurol.*, v.250, p.869–870, 2003.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.1753–1754, 2000.
- SAKAI, Y.; TSUKAHARA, T.; USHIDA, K. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from pigs in Japan. *Anim Sci J*, v.74, p.521-523, 2003.
- SÁNCHEZ, S.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, R.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; MORA, A.; HERMOSO DE MENDOZA, J.; ALONSO, J.M.; REY, J. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Vet. J.*, v.180, p.384–388, 2009.
- SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, A.; VIDAL, D.; BLANCO, M.; BALNCO, J.E.; MORA, A.; HERRERA-LEÓN, S.; ECHEITA, A. ALONSO, J.M.; REY, J. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet Microbiol.*, v.143, n.2-4, p.420-423, 2010.
- SEO, K.S.; LIM, J.Y.; YOO, H.S.; BAE, W.K.; PARK, Y.H. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.225–233, 2005.
- SCHIERACK, P.; STEINRÜCK, H.; KLETA, S.; VAHJEN, W. Virulence Factor Gene Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Clinically Healthy Pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, p.6680–6686, 2006.
- SCHIERACK, P.; RÖMER, A.; JORES, J.; KASPAR, H.; GUENTHER, S.; FILTER, M.; EICHBERG, J.; WIELER, L.H. Isolation and Characterization of Intestinal *Escherichia coli* Clones from Wild Boars in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n.3, p. 695–702, 2009.
- SILVA, J.S.V.; ABDON, M.M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq. agropec. bras.*, v.33, Número Especial, p.1703-1711, 1998.
- SILVA, M.P.; MAURO, R.A.; MOURÃO, G.; COUTINHO, M.E. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Rev. Brasil. Bot.*, v.23, n.2, p. 143-152, 2000.
- SKURNIK, D.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; AMORIN, C.; ROUQUET, P.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and

integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.57, p.1215–1219, 2006.

TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, 2005, 679p.

TISDELL, C.; TAKAHASHI, S. Feral animals in Australia – economic and ecological impact. *Geographical Sciences*, v.43, n.1, p. 37-50, 1988.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; LONDON, N.; STOBBERINGH, E.E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother*, v.45, n.5, p.663-671, 2000.

VAN DIJCK, P.J.; VAN DE VOORDE, H. Course of antibiotic sensitivities in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from animals. *Zentralbl Bakteriol [B]*, v.169, n.5-6, p.519-529, 1979.

WAHLSTRÖM, H.; TYSEN, E.; OLSSON ENGVALL, E.; BRÄNDSTRÖM, B.; ERIKSSON, E.; MÖRNER, T.; VAGSHOLM, I. Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.*, v.153, p.74–80, 2003.

WWF. *Natureza brasileira. Bioma Pantanal*. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/biomas/bioma_pantanal/> Acesso em: 14 mar. 2009.

IUCN (2000) The IUCN guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species. As approved by 51st Meeting of Council, <http://app.iucn.org/biodiversityday/100booklet.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A - Tabela 2: Bactérias isoladas de cada porco selvagem (*Sus scrofa*) estudado na sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense e suas respectivas regiões de isolamento.

ANEXO B - Protocolo de extração de DNA com o Kit BLOOD GENOMIC PREP SPIN (GE healthcare)

ANEXO C - Artigo aceito para publicação na Brazilian Journal of Microbiology

ANEXO A

Tabela 2: Bactérias isoladas de cada porco selvagem (*Sus scrofa*) estudado na sub-região da Nhecolândia e Rio Negro do Pantanal sulmatogrossense e suas respectivas regiões de isolamento.

Animal	Bactérias isoladas	Região corpórea
772 macho, 5 anos	<i>Serratia marcescens</i>	boca, nariz, reto e prepúcio
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha esquerda e reto
	<i>Pantoea sp</i>	orelha direita
	<i>Pseudomonas spp.</i>	nariz
	<i>Aeromonas caviae</i>	prepúcio
	<i>S. chromogenes</i>	orelha esquerda
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	orelha direita
773 macho, adulto	<i>Serratia marcescens</i>	nariz, orelha esquerda e direita, prepúcio
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	boca, nariz e reto
774 macho, adulto	<i>Serratia marcescens</i>	nariz, orelha direita e prepúcio
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca e nariz
	<i>Cedecea</i>	boca
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	reto e prepúcio
	bnete G-/ox+	orelha direita, reto e prepúcio
	bnete G+	orelha esquerda
capado e morto macho, adulto	<i>Serratia marcescens</i>	boca, nariz, orelha direita e reto
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha direita
	<i>enterobacteriaceae</i>	reto
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	boca, orelha esquerda e reto
	<i>Staphylococcus warneri</i>	boca
	bnete G-/ox+	orelha direita
775 fêmea, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha esquerda e direita, vagina
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	vagina
	<i>Cedecea</i>	nariz e vagina
	<i>Aeromonas caviae</i>	nariz
	bnete G-/ox+	boca e reto

776 fêmea, adulta	<i>Serratia marcescens</i>	nariz, orelha esq. e direita, reto e vagina
	<i>Cedecea</i>	nariz e reto
	<i>Pantoea sp</i>	orelha esquerda
	<i>Proteus</i>	boca
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	reto
	<i>Enterococcus</i>	vagina
	bnete G-/ox+	boca, nariz, reto e vagina
filhote 776 macho, 1 mês	<i>Serratia marcescens</i>	boca, nariz, orelha esq., reto e prepúcio
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha esquerda
	<i>Cedecea</i>	prepúcio
	<i>enterobacteriaceae</i>	orelha direita e reto
	bnete G-/ox+	orelha direita e reto
777 macho, adulto	<i>Serratia marcescens</i>	boca, orelha esquerda e direita
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha direita
	<i>Enterococcus</i>	prepúcio
	bnete G-/ox+	nariz, orelha esquerda e direita, reto
778 macho, 18 meses	<i>Serratia marcescens</i>	boca, nariz, orelha esq. e direita, reto
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca e prepúcio
	<i>enterobacteriaceae</i>	orelha esquerda
	<i>Aerococcus viridans</i>	prepúcio
	<i>Enterococcus</i>	reto e prepúcio
	bnete G-/ox+	orelha direita e prepúcio
	bnete G+	nariz e orelha direita
779 fêmea, adulta	<i>Serratia marcescens</i>	boca, nariz, orelha esq. e direita, reto e vagina
	<i>Hafnia alvei</i>	boca
	<i>E. coli</i>	reto
	<i>Pantoea spp.</i>	vagina
	<i>Enterococcus spp.</i>	boca, nariz, orelha direita, reto e vagina
	bnete G-/ox+	orelha esquerda
782 fêmea, 5 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca
	<i>Escherichia coli</i>	reto
	<i>enterobacteriaceae</i>	orelha esquerda
	<i>S. chromogenes</i>	vagina
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	vagina
	<i>Kocuria rosea</i>	vagina

	<i>Enterococcus</i>	vagina
	bnete G-/ox+	boca
Leitoa (filhote 1) femea, 15 dias	<i>Serratia marcescens</i>	boca
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha esquerda e direita
	<i>enterobacteriaceae</i>	orelha esquerda
	<i>S. chromogenes</i>	orelha direita
	<i>Enterococcus</i>	boca, nariz e orelha direita
	bnete G-/ox+	boca
	bnete G+	boca
783 femea, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha esquerda
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca e reto
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	orelha direita
	<i>enterobacteriaceae</i>	vagina
	<i>P. aeruginosa</i>	orelha direita
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	nariz
	<i>S. chromogenes</i>	vagina
	bnete G-/ox+	nariz e reto
	bnete G+	nariz
784 femea, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	boca
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	nariz e orelha direita
	<i>Cedecea</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	nariz
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	nariz
	<i>S. chromogenes</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	nariz e vagina
	bnete G-/ox+	reto
	bnete G+	reto
785 femea, 8 anos	<i>Serratia marcescens</i>	boca, orelha esquerda e vagina
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca e nariz
	<i>Kocuria varians</i>	nariz
	<i>Enterococcus</i>	orelha direita, reto e vagina
	bnete G+	nariz e orelha esquerda

786 macho, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	boca
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	nariz
	<i>Rahnella aquatis</i>	orelha direita
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	nariz
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	orelha esquerda
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	nariz, reto e prepúcio
bnete G-/ox+	prepúcio	
bnete G+	boca, nariz e orelha esquerda	
787 femea, 1 ano	<i>Serratia marcescens</i>	boca e orelha direita
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	reto
	<i>Enterobacter cloacae</i>	orelha esquerda
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	orelha esquerda
	<i>Cedecea spp.</i>	nariz
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	vagina
	<i>Enterococcus</i>	nariz, orelha esquerda, reto e vagina
bnete G+	reto	
788 macho, 6 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	orelha esquerda, reto e prepúcio
	bnete G-/ox+	boca, nariz, orelha esq. e direita, reto e prepúcio
	bnete G+	nariz, orelha esquerda e direita
789 femea, 2.5 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha direita
	<i>Buttiauxela agrestis</i>	orelha esquerda
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	boca e nariz
	<i>Kocuria rosea</i>	boca
	<i>Enterococcus</i>	reto
	bnete G-/ox+	boca, reto e vagina
	bnete G+	orelha direita e reto
790 femea, 4 anos	<i>Serratia marcescens</i>	boca
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	nariz
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	nariz
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	orelha esquerda
	<i>Enterococcus</i>	nariz, orelha esquerda e vagina
	bnete G-/ox+	reto
	bnete G+	orelha direita e vagina

791 macho, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	nariz
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	boca, nariz e prepúcio
	<i>Hafnia alvei</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	prepúcio
	<i>Kocuria rosea</i>	boca
	<i>Enterococcus</i>	nariz, reto e prepúcio
	bnete G-/ox+	reto
792 femea, 2 anos	<i>Serratia marcescens</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	orelha esquerda e direita
	<i>Escherichia coli</i>	reto e vagina
	<i>Cedecea spp.</i>	orelha esquerda
	<i>Proteus mirabilis</i>	boca
	<i>Enterococcus</i>	vagina
	bnete G-/ox+	nariz
bnete G+	reto	

Anexo B

Protocolo de extração de DNA com o Kit BLOOD GENOMIC PREP SPIN (GE healthcare)

1. Aquecer o tampão de eluição no banho-maria a 70°C;
2. Adicionar em um tubo tipo eppendorf 1,5mL de caldo BHI com bactéria cultivada durante a noite a 37°C sob agitação. Centrifugar a 11.000g por 10 minutos;
3. Descartar o sobrenadante;
4. Adicionar a cada tubo 20µl de proteinase K;
5. Adicionar a cada tubo 550 µl de solução de lise e homogeneizar no agitador;
6. Incubar por 10 minutos no mix a 30°C e 700rpm.
7. Neste meio tempo montar e identificar o tubo de coleta + mini coluna, individualmente para cada amostra;
8. Centrifugar a 11.000g por 30 segundos (Quick spin);
9. Transferir todo o conteúdo do tubo (600µl) para a mini coluna no tubo de coleta;
10. Centrifugar a 11.000g por 1 minuto;
11. Descartar o conteúdo do tubo de coleta;
12. Adicionar 500µl de solução de lise e centrifugar a 11.000g por 1 minuto;
13. Descartar o conteúdo do tubo de coleta;
14. Adicionar 500µl de tampão de lavagem;
15. Incubar 10 minutos na bancada.
16. Centrifugar a 11.000g por 3 minutos;
17. Transferir a mini coluna do tubo de coleta para um tubo tipo eppendorf (não deixar a solução de etanol tocar a coluna, pois a presença de etanol afeta a eluição do DNA);
18. Adicionar 200µl de tampão de eluição, previamente aquecida a 70°C , diretamente na coluna, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;
19. Centrifugar a 11.000g por 1 minuto;
20. Descartar a coluna e armazenar o tubo contendo DNA no freezer para ser utilizado posteriormente.

IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF MICROFLORA COLONIZING FERAL PIG (*Sus scrofa*) OF BRAZILIAN PANTANAL.

Lessa, SS¹; Paes, RCS¹; Santoro, PN¹, Mauro, RA²; Vieira-da-Motta, O¹.

¹Laboratório de Sanidade Animal, Setor de Doenças Infecto-Contagiosas, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Avenida Alberto Lamego, 2000. Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, Cep: 28013-600, RJ, Brazil. ²Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte/Embrapa-MS, Brazil.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance of bacteria is a worldwide problem affecting wild life by living with resistant bacteria in the environment. This study presents a discussion of outside factors environment on microflora of feral pigs (*Sus scrofa*) from Brazilian Pantanal. Animals had samples collected from six different body sites coming from two separated geographic areas, Nhecolandia and Rio Negro regions. With routine biochemical tests and commercial kits 516 bacteria were identified, with 240 Gram-positive, predominantly staphylococci (36) and enterococci (186) strains. Among Gram-negative (GN) bacteria the predominant specimens of Enterobacteriaceae (247) mainly represented by *Serratia* spp. (105), *Escherichia coli* (50), and *Enterobacter* spp. (40) and specimens not identified (7). Antimicrobial susceptibility was tested against 17 drugs by agar diffusion method. Staphylococci were negative to production of enterotoxins and TSST-1, with all strains sensitive towards four drugs and highest resistance toward ampicillin (17%). Enterococci presented the highest sensitivity against vancomycin (98%), ampicillin (94%) and tetracycline (90%), and highest resistance pattern toward oxacillin (99%), clindamycin (83%), and cotrimoxazole (54%). In GN the highest resistance was observed with *Serratia marcescens* against CFL (98%), AMC (66%) and AMP (60%) and all drugs was most effective against *E. coli* SUT, TET (100%), AMP, TOB (98%), GEN, CLO (95%), CFO, CIP (93%). The results show a new profile of oxacillin-resistant enterococci from Brazilian feral pigs and suggest a limited residue and spreading of antimicrobials in the environment, possibly because of low anthropogenic impact reflected by the drug susceptibility profile of bacteria isolated.

Keywords: Brazilian Pantanal, feral pig, antibiotic resistance pattern

INTRODUCTION

Pantanal is one of the most important wetlands ecosystems in the world comprehending a geographical region in the central South America continent, which border limit includes Brazil, Paraguay and Bolivia. Cyclical flooding characterizes the region and Brazilian Pantanal embraces the biggest part of the area with 140.000 km² (15). Water environment has been shown to be the most efficient niche for exchange of genes of antimicrobial resistance among microorganisms and selection for resistance is

proportional to time of exposure of bacteria to antimicrobial in the environment (2). Antimicrobial resistant bacteria have emerged around the world, and together with this phenomena the increasing of human mortality (17). The way bacteria acquire resistance may vary and for enterococci most of the cases of resistance is acquired throughout chromosomal mutation or gene acquisition (5). Fecal bacteria may survive in soil and one can speculate that the contact of feral pigs with environment could result in the exchange of resistant microorganisms after contact with

other animals, since these agents may be present in all sort of environment, such as in contaminated soil (3, 43). In domestic animals, such as in pigs farms several studies showed the prevalence of resistant bacteria around world (1, 11, 43) and in this context the wild life may represent a risk for human and domestic animals (33). It was also showed the association of use of antibiotics as a group medication in pig farms and colonization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pig and the transmission between different properties in The Netherlands (46). Gram-negative bacteria (GN) can also be found in a diverse myriad of samples, but water, soil and feces represent the main source of contamination, and although fecal coliforms such as *E. coli* may not survive for long period in extra-intestinal conditions their presence may indicate recent fecal contamination generated by warm-blooded animals, including humans (21). The use of drugs in animal also may influence in microorganisms antimicrobial resistance profile, including the environment contamination (38, 40, 49). Although Schierack and colleagues (41) declared that no data are available from *E. coli* microflora from wild boars, pathogenic strains of *E. coli* O 157:H7 and *Campylobacter* spp. were isolated from fecal samples of feral pigs in the central coast of California – USA, and contamination of environment was discussed involving these animals as a potential risk factor for the spread of food borne pathogens contamination and crop fields damages (23, 24), besides shedding zoonotic pathogens in surface water (6). It is also assumed that feral pigs may play a role in transmission zoonotic agents in Australia (33). Some other enterobacteria, such as non-fecal coliforms, and other groups of GN bacteria, characterized by their psychrotrophic nature and simple nutritional requirements, such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus* and *Vibrio*, in addition to the enterococci, may be recovered from environmental samples and enable them to persist for prolonged periods in environments such as water collections and soil, representing important contamination pathways (47). These microbes are common

in the intestinal microbiota but in special conditions they became opportunistic and because of this characteristic they are known as amphibionts (29). It has been proposed by several authors that antibiotic resistance patterns (ARPs) of *Escherichia coli* (27, 32) and fecal streptococci (19, 50, 51) can be used as phenotypic “fingerprints” to determine the source of fecal pollution in natural waters or food. This study aimed to identify microflora colonizing feral pigs (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal, localized in the Nhecolândia and Rio Negro wetlands areas and to examine their ARPs against drugs tested and staphylococci pathogenicity.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

The samples were collected in the sub region of Nhecolandia, Mato Grosso do Sul State (MS), Brazil (18°59'20”S and 56°37'07”W, see figure bellow), from 34 feral pigs (20 females and 14 males) in January 2006, from 12 animals (9 females and 3 males) in october 2008, and 10 animals (3 females and 7 males) in august 2008 in the sub region of Rio Negro (19°30'18”S and 55°36'44”W) (Figure 1).

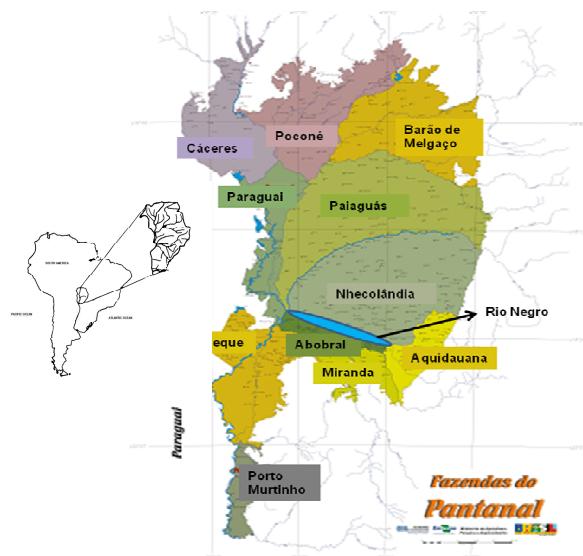


Figure 1: Brazilian wetlands showing with subregions according. Source: EMBRAPA <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/fazendas/fazesub.htm>

Feral pigs were live-captured in traps and all animals were humanely contended and then released after sampling. Commercial swabs

(Copan Diagnostics, Italy) were used to collect samples from oral cavity, nasal cavity, ear canals, anus, prepuce and vagina. All samples were ice conserved and transported to the laboratory.

Strains Isolation and Identification

The material was inoculated on chocolate agar (Acumedia, USA) supplemented by 5% defibrinate sterile horse blood and supplement VX at 37°C/24hs. Colonies were identified by Gram staining, cultured in blood agar (Acumedia, USA) and incubated at 37°C/24hs. Colony morphology, size, pigmentation and hemolytic pattern were observed, and tested for catalase (Sigma, USA) and oxidase production. *Enterobacteriaceae* strains were inoculated on MacConkey agar (Acumedia, USA) and identified by IMVIC and complementary tests of urease, manitol, DNase, lysine, saccharose, xilose, H₂S, arabinose, maltose, inositol, and EMB agar. Hemolytic ability of *E. coli* strains was tested in 5% sheep blood agar.

Differentiation among the species of genera *Streptococcus* was conducted by tolerance test to 6,5% NaCl, growth in bile, esculin hydrolysis, production of pyrrolidonyl arylamidase (PYR) enzyme (PROBAC, Brazil). As controls strains *Enterococcus faecalis* ATCC29212 from Fiocruz-RJ, Brazil, and *Streptococcus dysgalactiae*, isolated from cow milk in the Laboratory of Animal Sanitary/CCTA/UENF. *Micrococcaceae* genera was differentiated by oxidase test (Difco, USA), susceptibility to bacitracin and furazolidone, with *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Micrococcus luteus* ATCC4698 used as controls. Staphylococci pathogenicity was evaluated by testing for DNase production (DNase agar, Merck, Germany), coagulase production in rabbit plasma coagulase tube test (Difco, USA), and hemolysis in blood agar (Acumedia, USA) with *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *S. epidermidis* ATCC12228, used as positive and negative controls, respectively.

Commercial kits mini Api ID32 Staph, Api ID32E and rapid ID32 Strep (bioMérieux, France) with support of automated software (MiniApi, bioMérieux, Italy) were used for

strains identification.

Toxin detection in staphylococci

For enterotoxin production by staphylococci strains SET-RPLA (Oxoid, Denka Seiken, Japan) was used to detect SEA-SEE, and immunodiffusion test to detect TSST-1 by using specific rabbit polyclonal anti-TSST-1 affinity purified antibodies and purified staphylococcal TSST-1 toxin (12) as antigen and positive control.

Antimicrobial assays

Susceptibility antimicrobial was realized by the disk diffusion method according to NCCLS (31) in Mueller Hinton agar-MHA (Acumedia, USA). For enterococci, MHA was supplemented with 5% defibrinated sheep blood. Gram-positive strains were tested toward amoxicillin (AMO, 30µg), ampicillin (AMP, 10µg), cephalotin (CFL, 30µg), cephoxitin (CFO, 30µg), clyndamicin (CLI, 2µg), erytromycin (ERI, 15µg), gentamicin (GEN, 10µg), oxacyllin (OXA, 1µg), penicillin G (PEN, 10UI), cotrimoxazole (SUT, 25µg), tetracycline (TET, 30µg) and vancomycin (VAN, 30µg). For GN the antimicrobial tested included amoxicillin+clavulanic acid (AMC, 20/10µg), ampicillin (AMP, 10µg), cephalotin (CFL, 30µg), cephoxitin (CFO, 30µg), ciprofloxacin (CIP, 5µg), chloramphenicol (CLO, 30µg), enrofloxacin (ENO, 10µg), gentamicin (GEN, 10µg), clotrimoxazole (SUT, 25µg), tetracycline (TET, 30µg), tobramycin (TOB, 10µg). All tests were assayed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The feral pig (*Sus scrofa*), one of the world's worst invasive species, was introduced to the Brazilian Pantanal about 200 years ago and is thought to compete with the native species, such as white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) and collared peccary (*Pecari tajacu*). However, the competitiveness among these three species seemed not to occur, but feral pigs (*Sus scrofa*) may, nevertheless, impact the wildlife community in other ways as predators of eggs, by destruction of vegetation through rooting, or by functioning as disease reservoirs (15). Contact, throughout encounters, between these animals was

observed (15), but no information about possible transmission of microorganisms was described so far. Although feral pigs from this environment have the habit of mud bath and frequent contact with water collections in natural environment, the scope of genera of bacteria isolated was restrict in number with the approach used in this work. Others have investigated the microbiota of feral pigs from different countries, including pathogenic bacteria (33, 34, 45). After bacteriological routine processing of swabs, 516 specimens were isolated, with 240 Gram-positive bacteria, among them 36 *Staphylococcus* and 186 *Enterococcus* identified. The methodology used also identified one strain of *Aerococcus viridans*, two *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, three *Sporosarcina*, four *Kocuria* spp. and eight *Bacillus* spp.. Gram-negative bacteria classification resulted in 276 strains, with two *Aeromonas* spp., six *Acinetobacter*, 21 *Pseudomonas* spp. and 247 (table 1). *Serratia* spp. (n=105) and *E. coli* (n=50) were the GN species most prevalent in the study which were isolated from all body sites investigated. Environment may interfere on microbiota and involves factors such as water content, and the practice of using poultry litter in agriculture for crops nutrient purposes may not impact soil community of fecal indicator bacteria of farms, as observed under drought conditions (25). Neither fecal or water samples were examined in the present work, but studies showed that only 10 bacterial isolates are required to determine the most common clones in fecal samples (42), one can assume that the results showed may reflect the microbiota of feral pigs studied. *E. coli* may colonize specific intestinal sections (16). In Germany, the study of with 21 hunted feral pigs described clones of *E. coli* isolated from intestinal sections, all with different antimicrobial susceptibility profile when compared with susceptible strains isolated from domestic pigs (41). Strains of *E. coli* isolated in the present study had no hemolytic ability as observed in sheep blood agar, and contrary to other observations that found only one *E. coli* from jejunum portion of wild boar in Germany (41), and in accordance to others, commensal *E. coli* strains rarely contain virulence genes (10).

All *Staphylococcus* strains were submitted to classification by Api system, resulting in *S. simulans*(1), *S. saprophyticus*(1), *S. xylosum*(1), *S. warneri*(1), *S. epidermidis*(1), *S. haemolyticus*(3), *S. chromogenes*(5), *S. hyicus*(7), *S. sciuri*(11), and five coagulase-negative *Staphylococcus*. Studies from van Dijck and van de Voorde (45) found *S. aureus* and Poeta et al. (34) did not isolate staphylococci from wild life boars from forests of Belgium and Portugal, respectively. However, the identification of *Staphylococcus aureus* from domestic pigs is wide studied, including MRSA (4, 8, 14, 30, 46).

Staphylococci Patogenicity

Six *Staphylococcus* strains produced coagulase and 25 expressed DNase. DNase production by *S. sciuri* may be considered a patogenicity factor by some authors and an important tool for invasion and infection by the strains that present such a characteristic (44). This exoenzyme may participate in tissue degradation and invasion during infection by other coagulase-negative staphylococci, as in *S. epidermidis* (48).

None of the strains produced enterotoxins or TSST-1 by the methods used. Although no gene expression was evaluated in the present work, others have shown TSST-1 gene was not detected in 310 staphylococci strains isolated from pigs from different farms, among them 35 animals were colonized by MRSA (46).

Antimicrobial susceptibility

Thirteen strains (36%) of *Staphylococcus* spp. were sensitive toward all drugs tested. The *S. xylosum* strain colonizing the prepuce of one animal showed multiple resistance toward amoxicillin, penicillin, ampicillin and erythromycin (Table 3). Ampicillin was the most ineffective drug against staphylococci with resistance observed in 17% of strains followed of erythromycin (14%). Bagcigil et al. (8) showed that 38% *S. aureus* isolated from nasal cavity of pigs, dogs, horses and cattle were erythromycin resistant in Denmark, mostly animals living in farms and in frequent contact with macrolid drugs, and all strains

Table 1: Bacteria isolated from feral pigs (*Sus scrofa*) from Brazilian Pantanal, frequency of body colonization and number of animals, in the period of 2007 and 2008.

Bacteria (n)	Nasal cavity	Oral cavity	Ear canals	Anus	Vagina	Prepuce	Nº of pigs colonized
<i>Enterococcus</i> (n=186)	9	35	52	41	27	22	52/56
<i>Staphylococcus</i> (n=36)	7	4	14	1	7	3	23/56
<i>Lactococcus lactis lactis</i> (n=2)	0	0	0	1	0	1	2/56
<i>Aerococcus viridans</i> (n=1)	0	0	0	0	0	1	1/56
<i>Kocuria</i> spp. (n=4)	1	2	0	0	1	0	4/56
<i>Bacillus</i> (n=8)	0	2	3	1	0	2	4/56
<i>Sporosarcina</i> (n=3)	2	0	0	1	0	0	3/56
<i>Pseudomonas</i> spp (n=21)	1	0	18	1	0	1	17/56
<i>Aeromonas</i> (n=2)	1	0	0	0	0	1	2/56
<i>Acinetobacter</i> (n=6)	0	3	1	1	1	0	4/56
Enterobactérias (n=247)							53/56
<i>Kluyvera</i> (n=1)	0	0	0	0	1	0	1
<i>Ewingella</i> spp (n=1)	0	1	0	0	0	0	1
<i>Rahnella aquatis</i> (n=1)	0	0	1	0	0	0	1
<i>Buttiauxella agrestis</i> (n=2)	0	0	2	0	0	0	1
<i>Klebsiela</i> spp (n=2)	0	0	1	0	0	1	2
<i>Proteus</i> spp (n=2)	0	2	0	0	0	0	2
<i>Pantoea</i> spp (n=3)	0	0	2	0	0	1	3
<i>Erwinia</i> spp (n=3)	0	2	0	0	1	0	3
<i>Yersinia</i> spp (n=3)	0	1	1	0	1	0	3
<i>Edwardsiella tarda</i> (n=4)	0	2	0	2	0	0	3
<i>Citrobacter</i> (n=6)	0	1	5	0	0	0	4
<i>Hafnia alvei</i> (n=6)	0	1	4	0	1	0	4
<i>Cedecea</i> spp (n=11)	3	1	4	1	1	1	7
<i>Enterobacter</i> spp (n=40)	7	9	16	4	1	3	24
<i>Escherichia coli</i> (n=50)	0	6	8	29	6	1	28
<i>Serratia</i> spp (n=105)	15	25	41	10	5	9	33
Not identified (n=7)	0	0	4	2	1	0	6

belonging to a clonal group expressing the gene *ermC*. Armand-Lefevre et al. (4) studying *S. aureus* in pig farmers found high resistance to erythromycin among the isolates from farmers (66%), compared to controls (10% resistant), while 38% of the isolates from pigs were intermediate resistant toward the drug. The cause of staphylococci

ampicillin and erythromycin resistance found the present study is to be investigated, since domestic pigs were not investigated yet in the area investigated.

Data from 186 isolates of *Enterococcus* in the present study showed high sensibility to vancomycin (98%), ampicillin (94%), tetracyclin (90%), penicillin G (83%),

amoxicilin (70%) and cephalotin (69%), and with high resistance toward oxacillin (99%), clindamycin (83%) and cotrimoxazole (54%) (Table 3). Poeta et al. (34), evaluating the resistance of *Enterococcus* strains from feral pigs toward 11 antimicrobial drugs, observed higher resistance against erythromycin (48,5%), tetracycline (44,8%) and ciprofloxacin (17,9%) and lower resistance against ampicillin (3,7%), cloranphenicol (4,5%), estreptomycin (6,7%) and kanamycin (9%). The results in the present work with enterococci resistance toward erythromycin was 13%, and lower than that observed against the same drug in animals from Portugal (48,5%). Poeta et al. (34), observed 44,8% of tetracycline resistance among the

isolates, while in the present work the level of resistance was practically insignificant (6%), while resistance against ampicillin presented results compatible, with 6% resistance in the present work against 3,7% in the Portuguese enterococci isolates.

The species *E. faecalis* is known as one of the main resistant against drugs from strains isolated from domestic pigs in different countries (1, 20, 49). *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* present natural resistance to several antimicrobial drugs, including aztreonam, cotrimoxazole, clindamicin and cephalosporins, and habitually, lower sensibility toward aminoglycosides and penicillin G, moderate sensibility toward ampicillin and

Table 2: Antimicrobial susceptibility, in percentage, of 233 *Enterobacteriaceae* isolated from feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal, in the period of 2007 and 2008.

	<i>Serratia marcescens</i> (n=97)			<i>Enterobacter</i> spp. (n=35)			<i>Cedecea</i> (n=11)			outras (n=48)			<i>E. coli</i> (n=42)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMC	66	19	15	20	9	71	27	0	73	10	23	67	10	7	83
AMP	60	15	25	20	20	60	27	0	73	31	13	56	2	0	98
CFL	98	0	2	29	14	57	36	9	55	27	17	56	7	17	76
CFO	8	12	79	17	11	71	9	9	82	29	6	65	2	5	93
CIP	1	4	95	3	11	86	0	9	91	4	13	83	0	7	93
CLO	2	11	87	3	17	80	0	9	91	2	15	83	0	5	95
ENO	2	18	80	3	26	71	0	9	91	2	29	69	5	10	86
GEN	1	0	99	6	0	94	0	0	100	8	10	81	0	5	95
SUT	2	0	98	0	14	86	0	0	100	21	2	77	0	0	100
TET	51	30	20	3	3	94	9	0	91	8	13	79	0	0	100
TOB	4	5	91	6	3	91	0	9	91	6	10	83	0	2	98

cloranphenicol, but high sensibility toward glycopeptides (22). Otherwise, when resistant to the last drugs the *Enterococcus* represent an epidemiological risk, since the genes may be transferible to other bacteria (5). There is no reference to clindamycin resistance in enterococci isolated from pigs.

The level of resistance toward cotrimoxazole in enterococci was also discussed by others studying domestic pigs. Aubry-Damon et al. (7) associated a predominance of enteric bacteria resistant to drugs, among them cotrimoxazole, from pig farmer workers in France, and compared with isolates from pigs. The strains isolated from

controls (no pig farmers) were sensitive to cotrimoxazole, suggesting the transmission of resistant bacteria for pig farmers.

Among 186 isolates from enterococci from feral pig of Brazilian Pantanal, three strains presented intermediate profile toward vancomycin. The plasmid gene *vanA*, responsible for the high resistance to this drug may be transferable to humans and animals (36, 37). A study with *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from humans and pigs in Denmark showed that 17% of the pigs isolates and only 1,5% from humans isolates were vancomycin-resistant, and all possessed gene *vanA* (1). It has been assumed that vancomycin resistance is an intrinsic characteristic of fecal coliforms (9). Enterococci may also change their antimicrobial profile according to environmental water contamination with antibiotic residue detection in surface water and groundwater from swine plant operations (38).

Both *Lactococcus lactis lactis* strains presented sensitivity to most antibiotics tested, and one strain was resistant to clindamycin and other intermediate toward cephoxitin. *Aerococcus viridans* strains were sensitive against all drugs, except toward oxacillin, which presented resistance profile.

Natural or intrinsic and acquired antibiotic resistance in enterococci was described as inherent characteristics of species of the genus or a consequence of insusceptibilities to physicochemical and environmental factors, but no mention about resistance to penicillin or their derivative is credited to enterococci unless overproduction of penicillin-binding protein (PBP) occurs (26). According to CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) (13), enterococci may be a naturally oxacillin resistant bacteria. This is accordance with the results observed in this work, since virtually all enterococci strains presented resistance toward oxacillin. All

Table 3: Antimicrobial susceptibility, in percentage, of Gram-positive bacteria isolated from feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian pantanal, in the period of 2007 and 2008.

	<i>Enterococcus</i> (n=186)			<i>Staphylococcus</i> (n=36)			<i>Kocuria</i> (n=4)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMO	30	0	70	8	0	92	25	0	75
AMP	6	0	94	17	0	83	0	0	100
CFL	12	19	69	0	0	100	0	0	100
CFO	46	22	33	6	0	94	25	0	75
CLI	83	5	11	8	11	81	0	0	100
ERI	13	60	27	14	31	56	25	0	75
GEN	24	16	60	0	0	100	0	0	100
OXA	99	0	1	6	0	94	0	0	100
PEN	17	0	83	8	0	92	25	0	75
SUT	54	5	41	3	3	94	50	0	50
TET	6	4	90	0	0	100	0	0	100
VAN	0	2	98	0	0	100	0	0	100

together, these data indicate that the enterococci oxacillin resistance phenotype may be considered a stable genetic trait in this species isolated from feral pigs in Brazilian Pantanal, and never observed by others before. This alleged enterococci oxacillin resistance genetic trait deserves more investigations.

According to table 2, for GN bacteria the susceptibility towards drugs tested showed that the bacteria with highest resistance was *Serratia marcescens*, with 98% resistance toward Cephalotin, 66% toward amoxicillin+clavulanic acid and 60% toward ampicillin. *E. coli* was the most sensitive with 10% resistance profile toward AMC and 7% toward CFL. Schierack and colleagues (41) found no resistance among *E. coli* strains from feral pigs, while strains from domestic pigs were more resistant. GN bacteria in the gut can present different profile toward drugs, resistance against tetracycline was higher than other drugs in *E. coli* (18). Taking the data from resistance profile of GN bacteria in the study and with other published data in domestic pigs, one can infer that anthropomorphic pressure in Brazilian Pantanal environment is low. Others have observed that cattle-ranching activities may favor feral pigs and the current anthropogenic changes in the landscape could lead to changes in competitive dynamics between these animals and native species (15), but exchange of bacteria and influence of such activity on resistance profile of microorganisms is yet to be studied. Cattle are considered the primary reservoir of *E. coli* O157 (28), but fecal shedding by other domestic livestock and wildlife has been described (35, 39) and cattle-ranching and agriculture practice for food purposes activities in California could be affected by surface water visited by feral pigs and, consequently, containing pathogenic bacteria (23, 24).

In the literature no information is available on microbiota of feral pigs from Brazilian Pantanal. The environmental aspect emphasized in this work is based on the necessity to know the drug resistance of this microbiota to propose a possible interference of human activities in that environment. The

study presented may reveal that controversial aspects on bacterial resistance towards drugs may occur specially in areas with association of heavy pressure of livestock and agricultural activities, or natural resistance is inherent to wild microorganisms associated to wild animals. However, most of the isolates were sensitive to drugs tested in this study and the results may reflect a regional characteristic of Brazilian wetlands like Pantanal, with cyclic water seasons reflecting on drug profile of microorganisms living in that environment, suggesting dispersion of residues of any kind of contamination, including antimicrobial drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPERJ (E-26 103.097/2008-JCNE), UNIDERP and CNPq for financial support for OVM and FAPERJ for grant to the first author. To Dr. Luis Simeão do Carmo from Federal University of Minas Gerais, Brazil, for supplying TSST-1 immunodifusion kits. To Fiocruz-RJ for supplying ATCC strains. To technical support of M.L.B. Amaral and G.N. Teixeira from LSA/UENF.

REFERENCES

1. Aarestrup, F.M.; Agerso, Y.; Gerner-Smidt, P.; Madsen, M.; Jensen, L. B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 127–137.
2. Ali Abadi, F.S.; Lees, P. (2000). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 307-313.
3. Andrews, R.E.; Johnson, W.S.; Guard, A.R.; Marvin, J.D. (2004). Survival of Enterococci and Tn916-like conjugative transposons in soil. *Can. J. Microbiol.* 50, 957–966.
4. Armand-Lefevre, A.; Ruimy, R.; Andreumont, A. (2005). Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (5), 711-714.
5. Arthur, M.; Courvalin, P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1536–1571.
6. Atwill, E.R.; Sweitzer, R.A.; Pereira, M.G.; Gardner, I.A.; van Vuren D.; Boyce W.M. (1997). Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3946–3949.

7. Aubry-Damon, H.; Grenet, K.; Sall-Ndiaye, P.; Che, D.; Cordeiro, E.; Bougnoux, M.-E.; Rigaud, E.; Le Strat, Y.; Lemanissier, V.; Armand-Lefèvre, L.; Delzescaux, D.; Desenclos, J.C.; Liénard, M.; Andremont, A. (2004). Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farmers. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (5), 873-879.
8. Bagcigil, F.A.; Moodley, A.; Baptiste, K.E.; Jensen, V.F.; Guardabassi, L. (2007). Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet. Microbiol.* 121, 307-315.
9. Beers, M.H.; Berkow, R. (1997). The Merck manual of diagnosis and therapy. Merck & Co., Whitehouse Station, N.J.
10. Boerlin, P.; Travis, R.; Gyles, C.L.; Reid-Smith, R.; Janecko, N.; Lim, H.; Nicholson, V.; McEwen, S.A.; Friendship, R.; Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753-6761.
11. Camargo, I.L.B.C.; Gilmore, M.S.; Darini, A.L.C. (2006). Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 (11), 1123-1130.
12. Cardoso, H.F.T.; Carmo, L.S.; Silva, N. (2000). Detection of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52 (1), 07-10.
13. CASFM (2007). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2007.
14. de Neeling, A.J.; van den Broek, M.J.M.; Spalburg, E.C.; Van Santen-Verheuevel, M.G.; Dam-Deisz, W.D.C.; Boshuizen, H.C.; Van de Giessen, A.W.; van Duijkeren, E.; Huijsdens, X.W. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 366-372.
15. Desbiez, A.L.J.; Santos, S.A.; Keuroghlian, A.; Bodmer, R.E. (2009). Niche Partitioning Among White-Lipped Peccaries (*Tayassu pecari*), Collared Peccaries (*Pecari tajacu*), and Feral Pigs (*Sus scrofa*). *J Mammal.* 90 (1), 119-128.
16. Dixit, S.M.; Gordon, D.M.; Wu, X.Y.; Chapman, T.; Kailasapathy, K.; Chin, J.J. (2004). Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. *Microbiol.* 150, 1735-1740.
17. Furuya, E.Y.; Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature.* 4, 36-45.
18. Guerra, B.; Junker, E.; Schroeter, A.; Malorny, B.; Lehmann, S.; Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antim. Chem.* 52, 489-492.
19. Hagedorn, C.; Robinson, S.L.; Filtz, J.R.; Grubbs, S.M.; Angier, T.A.; Beneau, R.B. (1999). Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5522-5531.
20. Hammerum, A.M.; Lester, C.H.; Neimann, J.; Porsbo, N.J.; Olsen, K.E.P.; Jensen, L.B.; Emborg, H.D.; Wegener, H.C.; Frimodt-Moller, N. (2004). A vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate from a Danish healthy volunteer, detected 7 years after the ban of avoparcin, is possibly related to pig isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 547-549.
21. Harihan, R.; Weinstein, R.A. (1996). *Enterobacteriaceae*. In: Mayhall, C.G.(ed.) *Hospital epidemiology and infection control*. Williams & Wilkins, Baltimore. p.345-366.
22. Huycke, M.M.; Sahm, D.F.; Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 239-249.
23. Jay, M.T.; Cooley, M.; Carychao, D.; Wiscomb, G.W.; Sweitzer, R.A.; Crawford-Miksza, L.; Farrar, J.A.; Lau, D.K.; O'Connell, J.; Millington, A.; Asmundson, R.V.; Atwill, E.R.; Mandrell, R.E. (2007). *Escherichia coli* O157:H7 in Feral Swine near Spinach Fields and Cattle, Central California Coast. *Em. Infec. Dis.* 13(12), 1908-1911.
24. Jay, M.T.; Wiscomb, G.W. (2008). Food safety risks and mitigation strategies for feral swine (*Sus scrofa*) near agriculture fields. Proc. 23rd Vertebr. Pest Conf. (R. M. Timm and M. B. Madon, Eds.) Published at Univ. of Calif., Davis. p. 21-25.
25. Jenkins, M.B.; Endale, D.M.; Schomberg, H.H.; Sharpe, R.R. (2006). Fecal bacteria and sex hormones in soil and runoff from cropped watersheds amended with poultry litter. *Sci. Total Environ.* 358, 164- 177.
26. Klare, I.; Konstabel, C.; Badstübner, D.; Werner, G.; Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 269- 290.
27. Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165-170.
28. LeJeune, J.T.; Besser, T.E.; Rice, D.H.; Berg, J.L.; Stilborn, R.P.; Hanco, D.D. (2004). Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Appl. Env. Microbiol.* 70(1), 377-384.
29. Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. (1991). Microbiologia aquática. In: Roitman, I. et al. (eds.) *Tratado de Microbiologia vol. II. Microbiologia Ambiental*. Ed. Manole.
30. Nagase, N.; Sasaki, A.; Yamashita, K.; Shimizu, A.; Wakita, Y.; Kitai, S.; Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. *J. Veter. Med. Science* 64 (3), 245-250.
31. NCCLS 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 8th ed. (M2-A8).
32. Parveen, S.; Murphy R.L.; Edmiston, L.; Kaspar, C.W.; Portier, K.M.; Tamplin, M.L. (1997). Association of multiple-antibiotic-resistance profiles

- with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Env. Microbiol.* 63(7), 2607-2612.
33. Pavlov, P.M. (1988). Health risks to humans and domestic livestock posed by feral pigs (*Sus scrofa*) in North Queensland. Robert Wicks Research Station, Australia. Proceedings of 13th Vertebrate Pest Conference, University of California, Davis. p.141-144.
 34. Poeta, P.; Costa, D.; Igrejas, G.; Rodrigues, J.; Torres C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet. Microbiol.* 125, 368-374.
 35. Rice, D.H.; Hancock, D.D.; Besser, T.E. (2003). Faecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Rec.* 152, 82-83.
 36. Rice, L.B.; Carias, L.L.; Donsey, C.L.; Rudin, S.D. (1998). Transferable plasmid-mediated VanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 963-964.
 37. Rosato, A.; Pierre, J.; Billot-Klein, D.; Buu-Hoi, A.; Gutmann, L. (1995). Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptide and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 830-833.
 38. Sapkota, A.R.; Curriero, F.C.; Gibson, K.E.; Schwab, K.J. (2007). Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation. *Environ. Health Persp.* 115 (7), 1040-1045.
 39. Sargeant, J.M.; Hafer, D.J.; Gillespie, J.R.; Oberst, R.D.; Flood, S.J. (1999). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 215, 792-794.
 40. Sayah, R.S.; Kaneene, J.B.; Johnson, Y.; Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Env. Microbiol.* 71(3), 1394-1404.
 41. Schierack, P.; Römer, A.; Jores, J.; Kaspar, H.; Guenther, S.; Filter, M.; Eichberg, J.; Wieler, L.H. (2009). Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl. Env. Microbiol.* 75(3), 695-702.
 42. Schlager, T.A.; Hendley, J.O.; Bell, A.L.; Whittam, T.S. (2002). Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect. Immun.* 70, 1225-1229.
 43. Sengeløv, G.; Agersø, Y.; Halling-Sørensen, B.; Baloda, S.B.; Andersen, J.S.; Jensen, L.B. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* 28, 587-595.
 44. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Trajkovic, V.; Samardzic, T.; Cupic, M.; Svabic-Vlahovic, M. (2001). Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 47-53.
 45. van Dijck, P.J.; Van De Voorde, H. (1979). Course of antibiotic sensitivities in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from animals. *Zentralbl. Bakteriol. [B].* 169 (5-6), 519-529.
 46. van Duijkeren, E.; Ikawaty, R.; Broekhuizen-Stins, M.J.; Jansen, M.D.; Spalburg, E.C.; De Neeling, A.J.; Allaart, J.G.; Van Nes, A.; Wagenaar, J.A.; Fluit, A.C. (2008). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet. Microbiol.* 126 (4), 383-389.
 47. von Holy, A.; Holzapfel, W.H.; Dykes, G.A. (1992). Bacterial populations associated with Vienna sausage packing. *Food Microbiol.* 9, 45-53.
 48. Vuong, C.; Götz, F.; Otto, M. (2000). Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 68, 1048-1053.
 49. Wegener, H.C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol.* 6, 439-445.
 50. Wiggins, B.A. (1996). Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3997-4002.
 51. Wiggins, B.A.; Andrews, R.W.; Conway, R.A.; Corr, C.L.; Dobratz, E.J.; Dougherty, D.P.; Eppard, J.R.; Knupp, S.R.; Limjoco, M.C.; Mettenburg, J.M.; Rinehardt, J.M.; Sonsino, J.; Torrijos, R.L.; Zimmerman, M.E. (1999). Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3483-3486.