

***Yersinia enterocolitica* EM AVES SILVESTRES DE UM NÚCLEO DE REABILITAÇÃO**

CAMILE MILAN¹; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA²; MARINA DE MATTOS FERRASSO³, CLÁUDIO DIAS TIMM⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – cami_milan@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marinaferrasso@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – timmm@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui ampla diversidade de aves silvestres, sendo que a cada ano novas espécies são descobertas (ICMBio, 2011). A destruição do ambiente natural bem como a captura ilegal desses animais vêm comprometendo a sobrevivência das espécies em seu habitat (LADEIA; FENNER, 2010). Esse fato reflete no aumento do volume de atendimentos e apreensões em centros de reabilitação (LEITE, 2012).

O Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS, 2015) da Universidade Federal de Pelotas tem por objetivo receber animais oriundos do tráfico ilegal e tratar e reabilitar animais silvestres feridos, reintroduzindo-os ao seu ambiente natural. É formado por um grupo multidisciplinar de profissionais que atendem a uma demanda regional específica de atenção à fauna silvestre brasileira.

Campylobacter e *Salmonella* são os principais patógenos bacterianos causadores de doenças transmitidas por alimentos, sendo os animais de criação e aves silvestres os principais reservatórios ambientais (McCREA et al., 2006). Esses patógenos podem contaminar alimentos, causando assim doenças em humanos (LEJEUNE; DAVI, 2004).

Yersinia enterocolitica é um micro-organismo encontrado no trato intestinal de animais e que causa enfermidades em humanos (DOYLE; BUCHANAN, 2013). Essa bactéria é responsável por causar síndromes gastrointestinais, desde enterite aguda a linfadenite mesentérica (FALCÃO et al., 2006).

A região 16S rRNA é muito utilizada para identificar espécies através da técnica de reação em cadeia da polimerase (TREBESIU et al., 1998). *Y. enterocolitica* possui um fragmento conservado nessa região, confirmando sua presença com a utilização dos *primers* Y1 e Y2 (VAN DE PEER et al., 1996).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de *Campylobacter*, *Salmonella* e *Y. enterocolitica* em aves silvestres de um centro de reabilitação.

2. METODOLOGIA

Durante o período de novembro de 2014 a fevereiro de 2015, foram coletadas amostras de fezes, com uso de zaragatoas estéreis, das aves silvestres que chegaram ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) da UFPel. Foram totalizadas 34 amostras, obtidas de aves das famílias *Tytonidae* (2), *Strigidae* (3), *Thraupidae* (9), *Fringillidae* (4), *Accipitridae* (1), *Psittacidae* (4), *Icteridae* (1), *Turdidae* (3), *Cardinalidae* (1), *Tyrannidae* (1), *Furnariidae* (1), *Columbidae* (1), *Falconidae* (2) e *Charadriidae* (1). O material foi encaminhado ao laboratório em meio de transporte *Cary Blair* (Himedia, Mumbai, Índia), em caixas isotérmicas com gelo.

Para o isolamento de *Campylobacter spp.*, as zaragatoas com as amostras de fezes foram diretamente semeadas em superfície de Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, Michigan), adicionado de 0,4 % (m/v) de carvão ativado, 5 % (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio FBP (GEORGE et al., 1978) e 1 % (m/v) de suplemento *Campylobacter* I (Himedia, Mumbai, Índia) com mistura de antibióticos. As placas foram incubadas a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂). As colônias típicas, com brilho d'água e espreiadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram.

Para pesquisa de *Salmonella spp.*, as zaragatoas foram colocadas em 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia) para pré-enriquecimento e demais procedimentos conforme recomendado pela U.S. Food and Drug Administration – FDA (ANDREWS et al., 2014).

Para pesquisa de *Y. enterocolitica*, foi feita a semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Após incubação a 37 °C por 24 horas, três colônias lactose negativas foram semeadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e, após incubação a 37 °C por 24 horas foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70 °C. Posteriormente foi realizada a extração do DNA dos isolados e realizada a PCR (Tabela 1).

O DNA dos isolados foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001). Para identificação molecular de *Y. enterocolitica* foi realizada PCR conforme Neubauer et al. (2000). Os produtos de PCR, corados com GelRed, foram visualizados em gel de agarose 1,5% .

Tabela 1 - *Primers* utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*.

Primer	Sequência 5' a 3'	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
Y1	AATACCGCATAACGTCTTCG	16S	330	Neubauer et al. (2000)
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 34 amostras coletadas, duas albergavam *Y. enterocolitica* (5,8%), sendo uma da família *Turdidae* (*Turdus rufiventris*) e outra da família *Charadriidae* (*Vanellus chilensis*).

Niskanen et al. (2003) isolaram *Y. enterocolitica* de 5,6% de amostras de *Passeriformes* e aves marinhas coletadas na Suécia, resultado semelhante ao encontrado no nosso trabalho. Já Castro-Silva et al. (2011) não encontraram a bactéria em amostras de fezes de *Sula leucogaster* analisadas no litoral de Santa Catarina. No entanto, a espécie estudada e o local de coleta foram diferentes dos pesquisados neste trabalho, o que pode ter influência na diferença dos resultados encontrados.

As aves silvestres são consideradas reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*, podendo servir como propagadoras de micro-organismos devido à sua grande mobilidade (KAPPERUD; ROSEF, 1983). No entanto, em nenhuma das amostras analisadas foram encontrados esses patógenos.

Devido à capacidade de albergar micro-organismos, é importante que sejam realizados maiores estudos com aves silvestres de vida livre, de cativeiro e

apreensões, para entender melhor a epidemiologia e a relação entre a contaminação desses animais e a transmissão para humanos, outros animais e alimentos.

4. CONCLUSÕES

Aves silvestres podem servir como reservatório de *Y. enterocolitica*, sendo, conseqüentemente, potenciais disseminadores desse micro-organismo no ambiente, além de possíveis fontes de contaminação para humanos, outros animais e até mesmo alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. **Salmonella. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, Chapter 5.** 2014. Acessado em 11 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Atlas da fauna brasileira ameaçada de extinção em unidades de conservação federais.** Brasília, DF, 276 p., 2011.

CASTRO-SILVA, M.A.; MANOEL, F.C.; KRUEGER, J.; BARREIROS, M.A.B.; BRANCO, J.O. Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.19, n.4, p.520-524, 2011.

DOYLE, M.P.; BUCHANAN, R.L. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** 3ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2013.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P.; PITONDO-SILVA, A.; MALASPINA, A.C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1539-1548, 2006.

GEORGE, H.A.; HOFFMANN, P.S.; KRIEG, N.R.; SMIMBERT, R.M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.8, p.36-41, 1978.

KAPPERUD, G.; ROSEF, O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in Norway. **Applied Environmental Microbiology**, p.375-380, 1983.

LADEIA, L.Q.; FENNER, A. **Tráfico de animais silvestres.** 2010. 20f. Trabalho de conclusão (Especialização em Biociências Forenses) – Programa de Pós-graduação em Biociências Forenses, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

LEITE, T.O. **Uma discussão sobre a problemática da captura ilegal de aves no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2012. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna), Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LEJEUNE, J.T.; DAVI, M.A. Outbreaks of zoonotic enteric disease associated with animal exhibits. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1440–1445, 2004.

MCCREA, B.A.; TONOOKA, K.H.; VANWORTH, C.; BOGGS, C.L.; ATWILL, E.R.; SCHRADER, J.S. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. **Poultry Science**, v.85, p.136–143, 2006.

NEUBAUER, H.; HENSEL, A.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.58–62, 2000.

NISKANEN, T.; WALDENSTROM, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; OLSEN, B.; KORKEALA, H. vir-F-Positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p.4670-4675, 2003.

NURFS. **NÚCLEO DE REABILITAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE**. Universidade Federal de Pelotas. 2015. Online. Acessado em 18 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/ib/nurfs/inst.htm>

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ªed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

TREBESIOUS, K.; HARMSSEN, D.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J. Development of rRNA-targeted PCR and In situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2557-2564, 1998.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R.. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.3381-3391, 1996.