

ISOLAMENTO DE *Yersinia enterocolitica* DE MAMÍFEROS SILVESTRES DE UM CENTRO DE REABILITAÇÃO

DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA¹; CAMILE MILAN²; MARINA DE MATTOS FERRASSO³; CLÁUDIO DIAS TIMM⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cami_milan@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marinaferrasso@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Muitas espécies de animais silvestres de vida livre servem como reservatório de bactérias patogênicas que ameaçam a saúde humana e dos animais domésticos. Além disso, perpetuam patógenos no ambiente e assim oferecem risco à preservação da biodiversidade (DASZAK et al., 2000). Mamíferos de vida livre podem entrar em conflito com os seres humanos pelo convívio com os animais domésticos, pela própria caça ou pelo simples estreitamento das relações entre o homem e os animais silvestres (GORTAZAR et al., 2015; MENDONÇA et al., 2012).

Algumas bactérias como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp., causam enfermidades em humanos e podem contaminar os animais domésticos e silvestres (DOYLE e BUCHANAN, 2013; FRANCO e LANDGRAF, 2003). *Salmonella* e *Campylobacter* são os agentes mais frequentemente associados a diarréias bacterianas (CDC, 2013). *Y. enterocolitica* é responsável por causar síndromes gastrintestinais, variando de enterite aguda a linfadenite mesentérica (FALCÃO et al., 2006). *Salmonella* foi isolada do trato gastrintestinal de mamíferos silvestres de cativeiro no Brasil (GOMES et al., 2011).

O Núcleo de Reabilitação de Animais Silvestre – NURFS da Universidade Federal de Pelotas atende uma demanda regional específica de atenção à fauna silvestre brasileira. Tem por objetivo receber, triar, tratar e reabilitar os animais silvestres feridos, órfãos ou apreendidos no tráfico ilegal, para sua devolução à natureza (NURFS, 2015).

O objetivo do trabalho foi identificar a presença de *C. jejuni*, *C. coli*, *Y. enterocolitica* e *Salmonella* spp. nos mamíferos silvestres que se encontravam em processo de reabilitação no NURFS.

2. METODOLOGIA

No período compreendido entre novembro de 2014 e janeiro de 2015, foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto, com uso de zaragatoas estéreis, dos mamíferos presentes no NURFS (tabela 1) e encaminhadas ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), em caixas isotérmicas com gelo.

Tabela 1: Mamíferos coletados no NURFS.

Nome popular (Nome científico)	Quantidade	Idade
Bugio-ruivo (<i>Alouatta guariba</i>)	1	Filhote
Gato-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	1	Filhote
Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	1	Filhote
Sorro-do-campo (<i>Lycalopex gymnocercus</i>)	1	Filhote
Cuíca (<i>Monodelphis dimidiata</i>)	1	Adulto
Gambá (<i>Didelphis albiventris</i>)	10	Filhote

Para isolamento de *Campylobacter*, 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 foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram.

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. Os isolados foram recuperados em BHI a 37°C por 24 horas, quando necessário.

Para pesquisa da presença de *Salmonella*, 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).

O DNA dos isolados foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001) e estocado a -70°C. Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de *Y. enterocolitica*, conforme Neubauer et al. (2000) para a determinação da presença de uma região específica do gene rRNA 16S (Tabela 2). Os produtos de PCR, corados com GelRed, foram visualizados em gel de agarose 1,5%.

Tabela 2 – Primers utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*.

Primer	Sequência (5' a 3')	Tamanho da amplificação	Referências
Y1	AATACCGCATAACGTCTCG	330	Neubauer et al. (2000)
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi isolada *Y. enterocolitica* de 10% (1/10) dos exemplares de *Didelphis albiventris* e de nenhuma das demais espécies, totalizando a ocorrência da bactéria em 6,25% (1/16) do total de animais e de 16,67% (1/6) das espécies amostradas. *Salmonella* e *Campylobacter* não foram isolados.

D. albiventris são animais onívoros que se alimentam principalmente de invertebrados, grãos, frutos e pequenos vertebrados. Atuam como eficazes dispersores de sementes no ambiente (CÁCERES, 2002). Portanto, assim como as

sementes são espalhadas, o fato de *Y. enterocolitica* estar presente no trato gastrintestinal destes mamíferos indica alto potencial de disseminação do patógeno no ambiente e nos próprios centros de reabilitação, expondo outros animais silvestres e pessoas que trabalham nestes ambientes à contaminação.

Esta espécie de gambá é oportunista e sobrevive em florestas e descampados, podendo também ser encontrada nos centros urbanos e seus arredores (ROSSI e BIANCONI, 2011). Tendo em vista os hábitos alimentares bastante generalistas, gambás frequentam galinheiros de criação colonial e comercial, por consumirem pintos e ovos. Frequentam também outras criações, pela presença de ratos, grãos e rações, que compõem o vasto cardápio do marsupial (CÁCERES, 2012). Gambás encontram-se, portanto, em constante contato com os animais de produção que podem ser contaminados por *Y. enterocolitica* e albergar o patógeno, aumentando o risco de transmissão aos humanos.

A ocorrência de *Salmonella* no trato gastrintestinal das famílias *Canidae*, *Tayassuidae* e *Mustelidae* foi relatada por Gomes (2011), representada por dois sorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), dois catetos (*Pecari tajacu*) e um furão (*Galictis vittata*), respectivamente. Os gêneros *Alouatta* e *Leopardus* pesquisados por Gomes também não apresentaram *Salmonella*, assim como no nosso estudo. O isolamento de *Campylobacter* em mamíferos silvestres não tem sido relatado, porém existe a necessidade de mais estudos para esclarecer a importância deste patógeno nos mamíferos silvestres de cativeiro e de vida livre.

4. CONCLUSÕES

Y. enterocolitica pode ser encontrada no intestino de *D. albiventris*, que serve como portador deste patógeno, oferecendo potencial risco de disseminação.

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>

CÁCERES, N.C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.37, n.2, p.97-104, 2002.

CÁCERES, N.C.; LESSA, L.G. **O papel de marsupiais na dispersão de sementes. Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e conservação.** Campo Grande: Ed. UFMS, 2012.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 62, n. 15, p. 283-287, 2013.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, n.5452, p.443-449, 2000.

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

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P.; PITONDO-SILVA, A.; MALASPINA, A.C.; BROCCCHI, 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.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2003.

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.

GOMES, C.M.B.; BATISTA, K.S.; OLIVEIRA, S.A.; BEZERRA, L.M. Determinação de enterobactérias de mamíferos silvestres em criadouro conservacionista. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.11, n.2, p.74-80, 2011.

GORTAZAR, C.; DIEZ-DELGADO, I.; BARASONA, J.A.; VICENTE, J.; DE LA FUENTE, J.; BOADELLA, M. The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: a review. **Frontiers in Veterinary Science**, v.1, p.27, 2015.

MENDONÇA, L.E.T.; SOUTO, C.M.; ANDRELINO, L.L.; SOUTO, W.M.S.; VIEIRA, W.L.S.; ALVES, R.R.N. Conflitos entre pessoas e animais silvestres no semiárido paraibano e suas implicações para conservação. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.11, p.185-199, 2012.

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.

NURFS. **NÚCLEO DE REABILITAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE.** Universidade Federal de Pelotas, 2015. Acessado em 11 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/ib/nurfs/inst.htm>

ROSSI, R.V.; BIANCONI, G.V. Ordem Didelphimorphia, In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil.** Londrina: N. R. dos Reis, p. 31-69, 2011. 2v.

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