

MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS ISOLADOS DE RÉPTEIS RECEBIDOS EM UM NÚCLEO DE REABILITAÇÃO

THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES¹; CAMILE MILAN²; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA³; PRISCILA ALVES DIAS⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – thamiris.p@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – camil_milan@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – debora.rsilveira@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – dias.alvespri@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – timmm@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

O Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), desde 1998, recebe e trata animais silvestres que são encontrados feridos, órfãos ou oriundos do tráfico ilegal e, atualmente, é a principal referência de apoio ao trabalho de fiscalização e apreensão de animais silvestres pelas Polícias Ambiental, Civil e Militar Estadual e Federal na região sul do Rio Grande do Sul (NURFS, 2008). Jabutis, serpentes e lagartos têm se tornado bastante populares entre criadores que buscam atributos relacionados à beleza e à menor necessidade de alimentação, espaço e frequência de limpeza de que esses animais necessitam (SHIAU et al. 2006), o que gera um aumento do risco de entrada de diversos patógenos nas residências, especialmente de enterobactérias (JOHNSON-DELANEY, 1996), como *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo verificar a presença de micro-organismos patogênicos de interesse em saúde pública em répteis recebidos pelo NURFS da UFPel.

2. METODOLOGIA

Obtenção dos isolados

Durante o mês de novembro de 2014 até janeiro de 2015, foram coletadas amostras de fezes, com uso de zaragatoas estéreis, dos répteis que estavam ao NURFS da UFPel e encaminhadas ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), em caixas isotérmicas com gelo.

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, com brilho d'água e espreiadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram.

Para pesquisa de *Y. enterocolitica*, a semeadura foi por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Após, incubação a 37°C por 24 horas, três colônias lactose negativa 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 e HAMMACK, 2007).

Extração de DNA

O DNA dos isolados de *Y. enterocolitica* foi extraído conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL da cultura bacteriana foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante, coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante, descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL).

Identificação de *Y. enterocolitica*

Foi realizada PCR para identificação de *Y. enterocolitica*, conforme NEUBAUER et al. (2000), tendo como alvo o gene Y16S, que é específico para *Y. enterocolitica* (SHIVAJI et al. 2000). Cada 25 µL da mistura de reação continha os *primers* específicos para o gene rRNA 16S na concentração de 80 nM (Tabela 1); 200 µM de cada nucleotídeo; 0,5 U de *Taq* DNA polimerase; 1x de tampão; 2 µL (20 ng) de DNA. A amplificação foi realizada a 94°C durante 5 min, seguido por 36 ciclos de 94°C durante 45 s, 62°C por 45 s e 72°C por 45 s. Uma extensão final foi realizada a 72°C durante 7 min. 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

Foram coletadas amostras fecais de 22 répteis de três espécies diferentes, um *Trachemys dorbigni* (tartaruga-tigre-d'água), dois *Acanthochelys spixii* (cágados-pretos) e 18 *Pantherophis guttatus* (corn snake).

Dentre todas amostras coletadas, uma (4,54%) foi positiva para *Y. enterocolitica*. A amostra positiva corresponde a *P. guttatus*, conhecida popularmente como cobra-do-milharal. KAWAGA et al. (1993), encontrou resultado semelhante ao nosso, isolando *Y. enterocolitica* de uma de 201 amostras de fezes de outra espécie de ofídio (*Thamnophis sirtalis*).

P. guttatus tem hábitos semi-fossoriais, podendo habitar tanto locais secos, como úmidos, grama e áreas rochosas (HAMMERSON, 2007), além, também, de ser considerada um *pet*, tendo assim, ampla convivência com humanos (CABI, 2014) oferecendo risco de contágio caso albergue algum micro-organismo patogênico.

Não foi verificada a presença de *Salmonella* e de *Campylobacter* no nosso estudo. Diferentemente, SÁ & SOLARI (2001) isolaram *Salmonella* de diversas espécies de répteis nacionais e exóticos criados em cativeiro como animais de companhia e destacaram a ameaça potencial à saúde pública advinda da manutenção desses animais. A diferença nos resultados possivelmente se deve a diferença nas espécies estudadas.

4. CONCLUSÕES

P. guttatus podem albergar *Y. enterocolitica*, oferecendo risco de disseminação desse micro-organismo ao ambiente e às pessoas que entram em contato com as fezes contaminadas desses animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual online (BAM)**, cap. 5, 2011. Acessado em 20 jun. 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

CABI. ***Pantherophis guttatus (corn snake)***. CABI, 11 fev. 2014. Acessado em 25 jun. 2015. Online. Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/84655>

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.

HAMMERSON, G. A. *Pantherophis guttatus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2015.2. 2007. Acessado em 25 jun. 2015. Disponível em: www.iucnredlist.org

JOHNSON-DELANEY, C. A. Reptile zoonoses and threats to public health. In: MADER, D. R. (Ed.) **Reptile Medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 3, p. 512. 1996.

KAWAGA, J.; IVERSEN, J. O. Isolation of *Yersinia enterocolitica* (O:5,27 biotype 2) from a Common Garter Snake. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 29, n. 1, p. 127 – 129, 1993.

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

NURFS. NÚCLEO DE REABILITAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE. Universidade Federal de Pelotas. Acessado em 22 jun. 2015. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/ib/nurfs/inst.htm>

SÁ, I. V. A.; SOLARI, C. A. *Salmonella* in brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.32, p.293-297, 2001.

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

SHIAU, T.; HOU, P.; WU, S.; TU, M. A survey on alien pet reptiles in Taiwan. **Taiwania**, v.51, n.2, p.71-80, 2006.

SHIVAJI, S.; BHANU, N. V.; AGGARWAL, R. K. Identification of *Yersinia pestis* as the causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, n. 189, p. 247-252, 2000.