

BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE FEZES DE AVES SILVESTRES CAPTURADAS NO ENTORNO DE LEITARIAS

THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES¹; CELINA NUNES EBERSOL², DÉBORA
RODRIGUES SILVEIRA³, KAUANA KAEFER⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

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

²Universidade Federal de Pelotas – celinanunesebersol@outlook.com

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

⁴Universidade Federal de Pelotas – kauanakaeferr@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – timmm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Segundo BRASIL (2017), *Salmonella* é segundo principal micro-organismo relacionado aos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, nos anos de 2007 a 2017. MILLÁN et al. (2004) encontrou 8,5% (7/82) de *Salmonella enterica* em aves silvestres, ressaltando que estes animais são importantes reservatórios deste micro-organismo, o que representa um risco potencial para humanos e outros animais. FRANCO e LANDGRAF (2008) afirmaram que *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza e causa infecções entéricas de caráter zoonótico no homem; os animais destinados ao abate, os de estimação e os silvestres, incluindo mamíferos, aves, répteis e pescados, podem ser reservatórios do agente. A intoxicação por *Staphylococcus aureus* está em terceiro lugar na lista de micro-organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil (BRASIL, 2017). Seres humanos e a maioria dos animais domésticos podem ser portadores (FRANCO e LANDGRAF, 2008) dessa bactéria. *Listeria monocytogenes* é responsável por 1.600 pessoas doentes por ano, nos EUA, assim como por 260 mortes (CDC, 2017), é amplamente disseminada na natureza e tanto o ser humano, quanto animais e ambiente podem ser considerados reservatórios (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Sua importância em saúde pública se deve ao fato de a manifestação clínica ser grave, devido ao comprometimento do sistema nervoso central e também pelo fato de a infecção acometer principalmente gestantes, com consequências severas ao feto, incluindo aborto (GERMANO et al., 2015).

As aves silvestres encontram-se nos mais diversos habitats, podendo facilmente dispersar micro-organismos patogênicos no ambiente ou mesmo transmiti-los para animais domésticos de produção e humanos, caso estejam contaminadas (HUBÁLEK, 2004).

O objetivo deste trabalho foi isolar micro-organismos patogênicos de fezes de aves silvestres capturadas no entorno de uma leitaria.

2. METODOLOGIA

Foram capturadas aves silvestres no entorno de uma leitaria localizada na região sul do Rio Grande do Sul, com duas redes de neblina de 12 metros cada, colocadas em locais estratégicos. O esforço de captura foi de oito horas por semana, por três semanas consecutivas. As fezes foram coletadas através da inserção de zaragatoas estéreis nas cloacas dos animais. Após a coleta de fezes, as aves foram identificadas taxonomicamente quanto ao gênero e espécie, de acordo com a Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de

Registros Ornitológicos (PIACENTINI et al., 2015), marcadas discretamente no dorso com tinta inodora não tóxica (All-Weather, U.S.A.), de modo a serem identificadas no caso de recaptura, evitando assim, a duplicação de amostras, e imediatamente soltas.

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragatoas foram acondicionadas em tubos de ensaio com 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia, EUA). O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella* conforme recomendações da U.S Food and Drug Administration – FDA (ANDREWS et al., 2016).

Para *Yersinia*, foi realizada semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia) com a utilização da zaragatoa previamente obtida e incubação a 30°C por 24 h. Três colônias lactose negativas de cada amostra foram semeadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e, após incubação a 37°C por 24 horas foi feito teste de motilidade no ágar SIM (Micromed, São Paulo, Brasil), como descrito pela FDA (WEAGANT e FENG, 2016), para identificação da espécie *Yersinia enterocolitica*.

A determinação da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), com modificações. As zaragatoas com as amostras de fezes foram diretamente semeadas em superfície de ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 48 horas. De três a cinco colônias típicas e atípicas foram inoculadas em BHI e incubadas a 37°C por 24 h para realização da prova da coagulase, que se consistiu na mistura de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL de plasma de coelho e incubação a 37°C por 6 horas para observação de coagulação.

Para pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi feito um enriquecimento primário das zaragatoas com as fezes em caldo de enriquecimento para *Listeria* (UVM, *University Vermont medium*), incubado a 30°C por 24 h e os demais procedimentos conforme BRASIL (2003).

A identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* foi feita através de análise do DNA dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva através de multiplex-PCR, pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos *primers* au-F3, au-nucR, in-F, in-R3, hy-F1 e hy-R1, conforme SASAKI et al. (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram capturadas 18 aves silvestres, sendo um *Paroaria coronata* (Cardeal), dois *Furnarius rufus* (João-de-barro), dois *Turdus amaurochalinus* (Sabiá-poca), dois *Zonotrichia capensis* (Tico-tico), quatro *Columbina picui* (Rolinha-picuí) e sete *Turdus rufiventris* (Sabiá-laranjeira). Deste total, um (5,55%) foi positivo para *Staphylococcus aureus* e um (5,55%) para *Yersinia enterocolitica*, ambas amostras oriundas de *T. rufiventris*.

Outros estudos também relatam a presença de *Staphylococcus aureus* no intestino de aves silvestres, como é o caso de BRANCONARO et al. (2015), que isolou este micro-organismo de 1,2% (3/253) das aves estudadas em São Paulo, Brasil. De 218 zaragatoas com conteúdo fecal obtidas de aves migratórias, FOTI et al. (2011), na Itália, obtiveram 183 cepas de 28 diferentes espécies de enterobactérias e, destas 183, oito eram de *Y. enterocolitica*, o que condiz com o nosso estudo, em que também foi isolado este micro-organismo de fezes de aves.

A presença de *S. aureus* e *Y. enterocolitica* em *T. rufiventris* capturados em propriedade leiteira representa um risco potencial de contaminação, direta ou indireta, do homem e dos animais domésticos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que *T. rufiventris* pode albergar *S. aureus* e *Y. Entercolítica*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W. H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 15 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, p. 14-51. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos alimentares no Brasil – Dados atualizados em maio de 2017**. Disponível em: <portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11220-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 15 set. 2017.

BRANCONARO, P.; SAIDENBERG, A. B. S.; BENITES, N. R.; ZUNIGA, E.; DA SILVA, A. M. J.; SANCHES, T. C.; SWARG, T.; BRANDAO, P. E.; MELVILLE, P. A. Detection of bacteria and fungi and assessment of the molecular aspects and resistance of *Escherichia coli* isolated from confiscated passerines intended for reintroduction programs. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 65-72, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeria (Listeriosis)**. 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/listeria/>>. Acesso em: 15 set. 2017.

FOTI, M.; RINALDO, D.; GUERCIO, A.; GIACOPELLO, C.; ALEO, A.; DE LEO, F.; FISICHELLA, V.; MAMMINA, C. Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island. Of Ustica Sicily (Italy). **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 405-409, 2011.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco, B. G. M.; Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 04, p. 33-82.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 5ª edição. Baurieri – São Paulo: Editora Manoele, 2015. 1077 p.

HAUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of wildlife diseases**. v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.

KUDIRKIENE, E.; MALAKAUSKAS, M.; MALAKAUSKAS, A.; BOJESSEN, A. M.; OLSEN, J. E. Demonstrations of persistente strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 868-877, 2010.

MILLÁN, J.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; JUSTE, R. A.; BARRAL, M. *Salmonella* isolates from wild bird and mammals in the Basque Country (Spain). **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 23, p. 905-911, 2004.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L. F.; BETINI, G. S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A. C.; LIMA, L. M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F. R.; BENCKE, G. A.; COHN-HAFT, M.; FIGUEIREDO, L. F.; STRAUBE, F.C.; CESARI, E. Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 2, p. 91-298, 2015.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 765-769, 2010.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

WANNET, W. J. B.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H. A.; MAAS, H. M. E. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a Rapid and Sensitive Duplex PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4483-4486, 2001.

WEAGANT, S. D.; FENG, P. *Yersinia enterocolitica*. In: U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm072633.htm>. Acesso em: 30 set 2017.