

COMPARAÇÃO DE PERFIS MOLECULARES DE *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* ISOLADOS DE MORCEGOS QUE UTILIZAM COMO ABRIGO CONSTRUÇÕES

DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA¹; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES²;
KAUANA KAEFER³; MAURO CEZAR MAYATO NETO⁴; ANA MARIA RUI⁵;
CLÁUDIO DIAS TIMM⁶

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

²Universidade Federal de Pelotas – mirismoraes@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kauanakaefer@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – maurocmayato@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – ana.rui@ufpel.edu.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos coabitam construções com morcegos há milhares de anos. Muitas espécies de morcegos podem ser definidas como sinantrópicas, ou seja, têm forte associação ecológica com humanos. Observa-se morcegos utilizando construções humanas como abrigos permanentes, abrigos temporários, para reprodução e hibernação, podendo formar grandes colônias. Este estilo de vida pode resultar em benefícios diretos devido a vantagens energéticas. No entanto, a convivência com os seres humanos também traz alguns riscos (VOIGT et al., 2016), sendo um deles a transmissão de doenças.

De acordo com Mühlendorfer (2013), os morcegos podem adquirir vários microrganismos por meio de sua dieta e de fontes ambientais em habitats humanos e animais, entretanto a sua importância quanto à patogenia é pouco conhecida. A utilização e o desenvolvimento contínuo de métodos de investigação molecular, além de métodos de cultura tradicionais, são necessárias para a determinação da complexidade da microbiota de morcegos e para a detecção de outros patógenos bacterianos.

A identificação de cepas similares desses patógenos em distintas espécies gera uma informação importante para a compreensão das formas de transmissão dos agentes etiológicos. Tendo em vista a carência de estudos relacionados ao envolvimento de morcegos que habitam construções na epidemiologia de transmissão de *S. aureus* e *Y. enterocolitica* este trabalho teve por objetivo determinar e comparar os perfis moleculares de isolados destas espécies.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados isolados de *S. aureus* obtidos a partir de fezes de 21 indivíduos das espécies *Tadarida brasiliensis*, *Molossus molossus* (família Molossidae) e *Histiotus velatus* (família Vespertilionidae) de sete abrigos diferentes e nove isolados de *Y. enterocolitica* obtidos a partir de fezes de seis indivíduos da espécie *T. brasiliensis* de um abrigo. Todos os abrigos estavam localizados em construções no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas, município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

Os isolados em estoques de culturas compostas por caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Acumedia, Michigan) com 20% de glicerol foram mantidos a -20°C. Os isolados foram recuperados do estoque passando-se 100 µL de cada para tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 36°C por 24 h. No caso de *S. aureus*, os pellets das culturas foram submetidos à 100 µL de

lisostafina à 36°C por 1 h. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA dos isolados conforme Sambrook e Russel (2001).

Os perfis moleculares dos isolados de cada espécie foram analisados pela técnica de rep-PCR, fazendo uso do *primer* (GTG)₅ (VERSALOVIC et al., 1994). As condições da rep-PCR foram: 2,5 µL de DNA, 2 µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGT-3', 12,5 µL de Master Mix (Promega, Michigan) e 8 µL de água para completar o volume da reação. Para a amplificação, foram realizados um ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30 s, 45°C (*Y. enterocolitica*) ou 40°C (*S. aureus*) por 1 min e 60°C por 5 min, e finalmente um ciclo de 60°C por 16 min. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas, os produtos da rep-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison). Os perfis de bandas obtidos foram analisados comparativamente segundo Tenover et al. (1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis moleculares dos isolados de *S. aureus* demonstram que cepas indistinguíveis são comuns entre diferentes animais e diferentes abrigos (Figura 1).

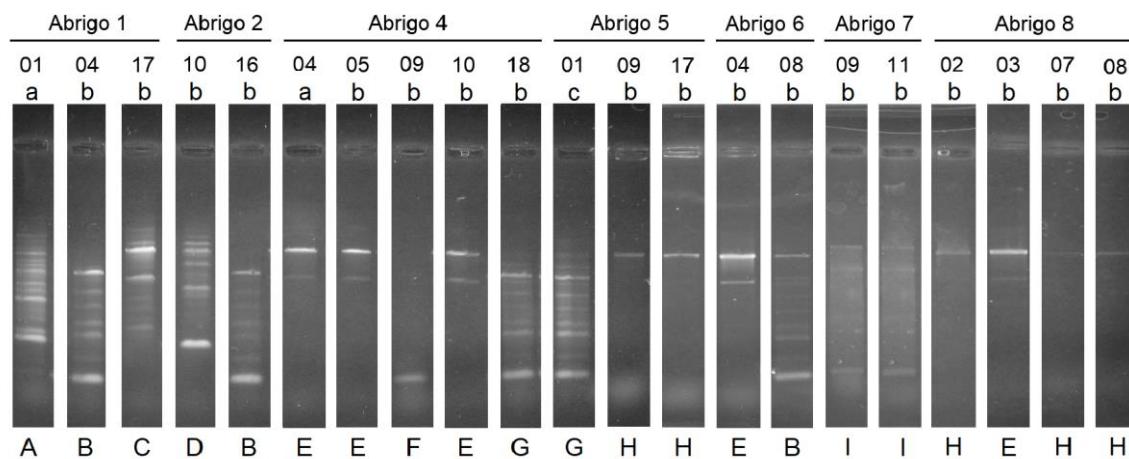


Figura 1: Gel de agarose 1,5% após eletroforese horizontal dos produtos amplificados em PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) corados com Diamond dos isolados de *Sthaphylococcus aureus* obtidos de amostras de fezes de indivíduos das espécies *Molossus molossus* (a), *Tadarida brasiliensis* (b) e *Histiotus velatus* (c), capturados em sete abrigos. O número corresponde a cada animal coletado e os perfis estão agrupados por letras maiúsculas de acordo com a similaridade.

O animal quatro do abrigo quatro, da espécie *M. molossus*, albergava um isolado indistinguível dos isolados dos animais cinco e 10 do mesmo abrigo, quatro do abrigo seis e três do abrigo oito, todos estes *T. brasiliensis* (perfis moleculares E). O indivíduo da espécie *H. velatus* albergava um isolado de *S. aureus* indistinguível ao isolado do animal 18, da espécie *T. brasiliensis* capturado no abrigo quatro (perfis G). Outros isolados obtidos de *T. brasiliensis* apresentaram perfis indistinguíveis entre abrigos (perfis B e H). Estes resultados demonstram que cepas indistinguíveis podem estar presentes em indivíduos de diferentes espécies e diferentes abrigos, havendo uma relevância em termos de transmissão entre morcegos ou sugerindo a existência de fontes de contaminação comuns.

Os perfis moleculares dos isolados de *Y. enterocolitica* demonstram que apenas isolados obtidos a partir do mesmo animal foram indistinguíveis (Figura 2), já comparando os isolados entre animais eles são considerados distintos.

Diferentemente dos isolados de *S. aureus*, os isolados de *Y. enterocolitica* parecem infectar os animais e permanecer no trato gastrointestinal sem maior potencial de transmissão e disseminação entre animais e abrigos.

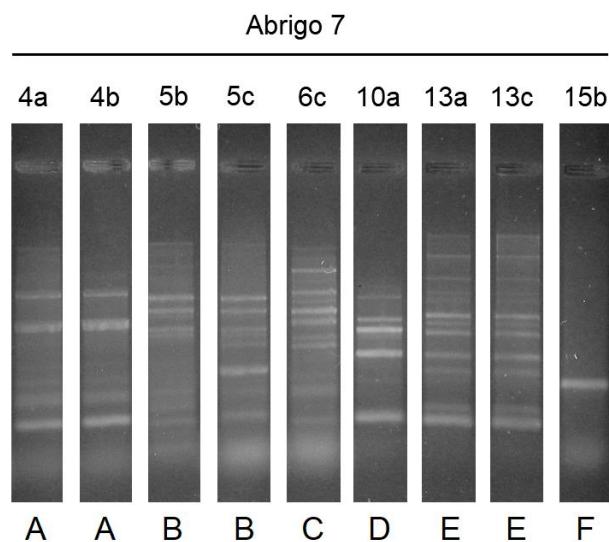


Figura 2: Gel de agarose 1,5% após eletroforese horizontal dos produtos amplificados em PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) dos isolados de *Yersinia enterocolitica* corados com Diamond obtidos de amostras de fezes de indivíduos das espécies *Tadarida brasiliensis* abrigados em uma mesma construção. Os números são correspondentes a cada animal coletado e a letra minúscula correspondente ao isolado, os perfis estão agrupados por letras maiúsculas de acordo com a similaridade.

Todos os animais que albergavam *Y. enterocolitica* eram da espécie *T. brasiliensis*. Mühlendorfer et al. (2010), após o isolamento de *Y. enterocolitica* de uma espécie de morcego insetívor, da espécie *Pipistrellus pipistrellus*, especularam que as possíveis fontes de contaminação para o morcego foram insetos ou águas contaminadas. *T. brasiliensis* também é uma espécie insetívora, portanto deve-se considerar estas fontes de contaminação como possíveis, já que de acordo com os perfis de bandas obtidos dificilmente ocorra a disseminação direta de um morcego para o outro.

A presença destes morcegos carreando *S. aureus* e a constatação de cepas comuns entre animais e abrigos em construções humanas salientam um problema para saúde pública, pois o microrganismo é disseminado de colônia em colônia, aumentando o risco de transmissão através do contato direto ou indireto com as fezes contaminadas.

4. CONCLUSÕES

Perfis moleculares indistinguíveis de isolados de *S. aureus* podem ser obtidos de fezes de *T. brasiliensis*, *M. molossus* e *H. velatus* e podem ser comuns entre abrigos. A presença de cepas comuns entre morcegos e abrigos sugerem que há uma interação de transmissão de *S. aureus* entre os morcegos do mesmo abrigo e de outros abrigos da região. Por outro lado, as cepas de *Y. enterocolitica* de cada *T. brasiliensis* foram classificadas como diferentes entre si, indicando não ter havido transmissão recente entre eles.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MÜHLDORFER, K. Bats and bacterial pathogens: a review. **Zoonoses and Public Health**, v.60, n.1, p.93-103, 2013.

MÜHLDORFER, K.; WIBBELT, G.; HAENSEL, J.; RIEHM, J.; SPECK, S. *Yersinia* species isolated from bats, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.3, p.578-580, 2010.

PACHECO, S.M.; SODRÉ, M.; GAMA, A.R.; BREDT, A.; CAVALLINI, E.M.; MARQUES, R.V.; BIANCONI, G. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, v.16, n.1, p.629-647, 2010.

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

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKESEN, 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 sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular Biology**, v.5, n.1, p.25-40, 1994.

VOIGT, C.C.; PHELPS, K.L.; AGUIRRE, L.F.; SCHOEMAN, M.C.; VANITHARANI, J.; ZUBAID, A. Bats and buildings: the conservation of synanthropic bats. In: **Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a changing world**. Springer, Cham, 2016. p.427-462.