

***Campylobacter* spp. isolados de aves silvestres capturadas no entorno de aviários**

THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES¹; DAIANE WILSMANN²; JESSIKA BOEIRA³
PRISCILA ALVES DIAS⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

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

² Universidade Federal de Pelotas – daianewilsmann@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – jessikaboeira@yahoo.com.br

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

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

1. INTRODUÇÃO

A microbiota fecal de aves silvestres tem sido pouco estudada. Há poucos trabalhos sobre a ocorrência de bactérias de importância em saúde pública, particularmente no Brasil. Patógenos com potencial zoonótico, como *Campylobacter* spp., tem sido isolado dessas aves (KAPPERUD et al., 1983).

Campylobacter está entre os micro-organismos mais comumente associados à toxinfecções alimentares envolvendo o consumo de produtos de origem animal (CDC, 2014). Essencialmente não patogênico para as aves, *Campylobacter* não representa problema para os sistemas de produção avícola, o que faz com que seu controle seja negligenciado nos aviários (GERMANO & GERMANO, 2003). Atraídas pela oferta de alimentos fornecidos aos frangos em produção, as aves silvestres, caso alberguem *Campylobacter*, possivelmente possam ser potenciais disseminadoras desse micro-organismo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação por *Campylobacter* de aves silvestres capturadas no entorno de aviários.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido em dez aviários situados na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Para a captura das aves, foram utilizadas quatro redes de neblina, de doze metros cada uma. As redes foram colocadas em locais estrategicamente escolhidos no entorno dos aviários, por dois dias, em dois períodos de quatro horas por dia, pela manhã e ao fim da tarde, totalizando um esforço de captura de 16 horas por aviário. As aves capturadas foram taxonomicamente identificadas quanto ao gênero e espécie, de acordo com a Lista das Aves do Brasil, do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2011) e foram coletadas amostras de fezes. Estas amostras eram obtidas diretamente da cloaca, com o uso de zaragatoas e encaminhadas para análises em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia).

Com o objetivo de isolar 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 espalhadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. Naquelas em que foram observados bastonetes delgados, em forma de S ou de "asa de gaivota", foram realizados testes das enzimas catalase e oxidase. As colônias suspeitas positivamente foram criopreservadas em meio estoque, constituído por 1 mL soro fetal bovino (FBS, Gibco, Invitrogen), 1 mL glicerol e 8 mL caldo Muller Hinton (Himedia, Índia). A confirmação dos isolados suspeitos foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA foi extraído com *kit* comercial Ilustra Bacteria GenomicPREP Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a partir de um *pellet* de colônias obtido diretamente das placas. O DNA foi analisado através da técnica de multiplex PCR para identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, de acordo com protocolo descrito por HARMON et al. (1997). Foram utilizados dois pares de *primers*: par pg 3/pg 50, que amplificam uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, e o par C-1/C-4, que amplificam uma região específica somente presente em *C. jejuni*. Cada reação teve um volume final de 25 µL. Foram utilizados 12 µL de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µL (20 pmol) de cada *primer*, 1 µL de DNA (na concentração de 5nmol/µL) e 4 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 45°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 e a cepa *C. coli* CCAMP1003, cedida pelo setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. As bandas foram visualizadas com utilização de GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), um corante de ácidos nucleicos que emite fluorescência na presença de luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram coletadas 189 aves silvestres, de diversas espécies. As mais frequentes foram *Zonotrichia capensis*, com 41 (22,78%) aves capturadas e 39 (20,63%) de *Sicalis flaveola*, ambas da família *Emberizidae*. Ambas espécies têm hábitos alimentares semelhantes, o que corrobora para que tenham sido capturadas em grande número, uma vez que sua alimentação é predominantemente granívora e o entorno do aviário tem abundante quantidade de alimentos para elas. Do total de amostras, 9 (4,76%) foram positivas para *Campylobacter*. Devido à dificuldade de cultivo da bactéria, cinco não foram estocadas, não sendo possível a identificação molecular. Os quatro (2,12%) isolados estudados foram obtidos de *S. flaveola* e identificados como 1 (25%) de *C. jejuni* e 3 (75%) de *C. coli*.

Em outro trabalho (WILSMANN et al., 2012), também desenvolvido no sul do Rio Grande do Sul foi isolado *Campylobacter* de oito (32%) amostras de fezes de *C. ruficapillus*, significando que outras espécies de aves silvestres também podem albergar esta bactéria.

4. CONCLUSÕES

S. flaveola pode ser portador de *Campylobacter*, sendo potencial transmissor do micro-organismo para os frangos em produção ou qualquer animal, incluindo o

homem, que entre em contato fezes dessas aves. O papel das aves silvestres como fontes de contaminação ainda não é bem esclarecido, o que reforça a necessidade de estudos nessa área.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 22, p. 749-755, 2014.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS [CBRO]. **Listas das aves do Brasil**, 10ª ed., 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>>. Acesso em: 08 julho 2014.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Ed. 2, Editora Varela, p. 215-275, 2003.

HARMON, K.M; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

KAPPERUD, G., AND O. ROSEF. **Avian wildlife reservoir of *Campylobacter foetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway**. Applied and Environmental Microbiology 45: 375–380. 1983.

WILSMANN, D.E.; DIAS, P.A.; HEINEN, J.G.; CORSINI, C.D.; CALABUIG, C.; TIMM, C.D. *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de aves silvestres. In: XXI Congresso de Iniciação Científica e IV Mostra Científica, 2012, Pelotas. **Anais do...** Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2012/anais/pdf/CA/CA_00309.pdf>. Acesso em: 08 julho 2014.