



PÂMELA COSTA CUSTÓDIO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE *Yersinia enterocolitica*. EM
MORCEGOS SINANTRÓPICOS**

LAVRAS – MG

2023

PÂMELA COSTA CUSTÓDIO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE *Yersinia enterocolitica*. EM
MORCEGOS SINANTRÓPICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras na forma de artigo
científico como parte das exigências do curso de
Ciências Biológicas, para o título de Bacharel.

Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientadora

M.e. Amanda Carvalho Rosado Ferreira

Coorientadora

LAVRAS - MG

2023

*À minha mãe, Dircéia por todo incentivo, e
esforços para me ver conquistar os meus
sonhos.*

*À minha querida avó Maria (in memoriam),
cuja presença foi essencial na minha vida.*

Dedico.

“Quando algo é importante o suficiente, você realiza, mesmo que as chances não estejam a seu favor.”

(Bill Gates)

AGRADECIMENTOS

Quando me deparei com a diversidade da vida na Terra, senti uma necessidade profunda de entender como ela surgiu, como evoluiu e como ela funciona, a Biologia oferece respostas para muitas dessas perguntas. Uma razão fundamental para minha escolha desse curso foi o potencial da Biologia para fazer a diferença na saúde e bem-estar da humanidade, podemos entender patógenos, desenvolver vacinas e tratamentos eficazes. A capacidade de contribuir para a saúde pública e a prevenção de doenças é um aspecto gratificante. O conhecimento abrangente adquirido ao longo da minha graduação vai ser essencial na minha vida, pois me permite não apenas apreciar a beleza da vida, mas também contribuir para o avanço da ciência e para a resolução de desafios globais relacionados à saúde, ao meio ambiente e à conservação da biodiversidade.

A jornada foi muito longa e difícil, mas foi nessa jornada que eu cresci, aprendi e me fortaleci. Essa conquista não apenas adiciona uma valiosa qualificação profissional em minha vida, mas também fortalece minha crença em mim mesma de que consigo realizar meus sonhos, hoje sou uma pessoa mais resiliente e preparada para enfrentar futuros desafios.

Estou encerrando uma etapa muito importante para essa jornada chamada vida, a graduação. Portanto, devo deixar um breve agradecimento a algumas pessoas que foram essenciais para os meus processos de aprendizado e desenvolvimento durante esses anos.

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por me guiar e fortalecer ao longo desta jornada, proporcionando-me saúde e força para alcançar a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, em especial à minha mãe, Dircéia, sou imensamente grata pela dedicação incansável em oferecer o melhor para mim. Eu jamais chegaria onde estou sem você, seu exemplo de vida e sua determinação foram luzes que me guiaram em meio às dificuldades. Sem o apoio e o incentivo de vocês, eu não estaria aqui hoje, celebrando este momento de conquista.

Ao meu querido, Matheus, hoje meu Marido, agradeço por sua compreensão, paciência e apoio inestimável durante todo o período. Seu carinho e incentivo foram a motivação extra que eu precisava para seguir em frente.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão e admiração à Dra. Elaine Maria Seles Dorneles e à M.e. Amanda Carvalho Rosado Ferreira, minhas orientadoras. É uma verdadeira honra tê-las como mentoras e guias neste final de percurso acadêmico. Deixo aqui, meu sincero agradecimento por esta valiosa oportunidade.

Agradeço, com profunda emoção, à minha querida avó Maria, que infelizmente veio a falecer. Sua presença em minha vida foi um presente inestimável, e suas memórias e ensinamentos continuarão vivos em meu coração para sempre.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Lavras, em especial meu profundo agradecimento pela excelência da qualidade técnica de cada um de vocês. Suas aulas e ensinamentos foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

Agradeço a todos os alunos, técnicos, professores e funcionários dos Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva, por todo apoio técnico e profissional imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar a presença de DNA da bactéria *Yersinia enterocolitica*. em amostras de fígado de 144 morcegos da coleção de mamíferos da Universidade Federal de Lavras (CMUFLA). O DNA foi extraído utilizando o kit ‘‘Genomic DNA Purification Kit (Wizard ®)’’. Para a amplificação do DNA foram aplicados os iniciadores F e R. Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, com voltagem de 110 V, e foi adicionado brometo de etídio. 0,4µL. As análises da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) revelaram a presença de DNA de *Yersinia enterocolitica* em 5 das 144 amostras de tecidos de morcego testadas.

Palavras-chave: *Yersinia enterocolitica*. PCR. Epidemiologia. Zoonoses.

ABSTRAT

The aim of this study was to use the polymerase chain reaction (PCR) technique to identify the presence of *Yersinia enterocolitica* DNA in liver samples from 144 bats from the mammal collection at the Federal University of Lavras (CMUFLA). The DNA was extracted using the "Genomic DNA Purification Kit (Wizard ®)". To amplify the DNA, primers F and R were applied. The PCR products were then subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel at a voltage of 110 V, and 0.4µL ethidium bromide was added. Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses revealed the presence of *Yersinia enterocolitica* DNA in 5 of the 144 bat tissue samples tested.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*. PCR. Epidemiology. Zoonoses.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
	2.1 Agente etiológico.....	11
	2.2 Patogenicidade	11
	2.3 Relatos de casos	12
3.	METODOLOGIA	14
	3.1 Amostragem.....	14
	3.2 Extração de DNA	18
	3.3 Detecção de <i>Yersinia</i> via PCR	18
	3.4 Eletroforese em Gel de Agarose.....	19
4.	RESULTADOS	19
5.	DISCUSSÃO.....	20
6.	CONCLUSÃO	21
7.	REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são bem conhecidos por fornecerem uma série de serviços ecossistêmicos essenciais, especialmente relacionados com a sua dieta e comportamento de forrageamento (KUNZ et al., 2011). Eles contribuem para a polinização de diversas espécies vegetais, auxiliam no controle de populações de insetos, essenciais para a agricultura, e desempenham um papel fundamental na dispersão de sementes, facilitando a regeneração de ecossistemas. É válido ressaltar que os morcegos são os principais contribuintes para a diversidade biológica (HUTSON et al., 2001). O mundo apresenta cerca de 1300 espécies de morcegos identificadas, sendo que o Brasil comporta 179 destas espécies (DE SOUZAA et al., 2021). Dentre essa diversidade de espécies algumas tem se adaptado muito bem aos centros urbanos, adquirindo um comportamento sinantrópico o que pode contribuir para a sua importância como hospedeiros de doenças.

A presença de microrganismos patogênicos em morcegos já foi relatada por diversos autores (MÜHLDOERFER et al 2010; FERREIRA et al., 2021; SZENTIVANYI et al. 2023) representando uma preocupação significativa para a saúde pública. Entre os gêneros já identificados em morcegos está o gênero *Yersinia*, que compreende um grupo de bactérias Gram-negativas, com pelo menos 28 espécies encontradas em diversos habitats naturais, cada uma com diferentes níveis de patogenicidade. a bactéria tem importância significativa em termos de saúde pública, segurança alimentar e pesquisa microbiológica. Entre as espécies, *Yersinia enterocolitica* se destaca por ser patogênica para humanos (BOTTONNE et al. 2015; HAMMERL et al. 2021) causando gastroenterite aguda acompanhada dos sintomas de febre, dor de cabeça e dor abdominal intensa, sendo essa última podendo ser confundida com apendicite.

A detecção de *Yersinia enterocolitica* em morcegos é essencial para a implementação de medidas preventivas, tanto para a proteção destes como para evitar a disseminação de potenciais patógenos para outros organismos e o ambiente. Portanto, é fundamental a utilização de métodos específicos para a detecção desta bactéria nas amostras de tecidos de morcegos sinantrópicos, a fim de contribuir para a segurança sanitária e a preservação desses animais. Diante disso, este estudo tem como objetivo geral utilizar a PCR como uma ferramenta de diagnóstico para analisar a presença de *Yersinia enterocolitica* em amostras de tecidos de morcegos sinantrópicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agente etiológico

O gênero *Yersinia* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e exibe uma morfologia em forma de bastonete Gram-negativo. Metabolicamente, é considerado um organismo anaeróbio facultativo, capaz de se desenvolver tanto em ambientes aeróbicos quanto anaeróbicos. Porém, seu crescimento é favorecido pela presença de oxigênio (QUINN, P. J. et al 2005).

Quando as bactérias são coradas por coloração de Gram, elas podem ser divididas em duas grandes categorias com base nas características de sua parede celular: As bactérias Gram-positivas retêm o corante índigo-violeta, enquanto as bactérias Gram-negativas retêm o corante carmim (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Porém, as bactérias do gênero *Yersinia* têm coloração bipolar, o que significa que as extremidades das células são mais escuras e a parte central é mais clara. Essa coloração é uma pista diagnóstica que ajuda os microbiologistas a identificar essas bactérias como *Yersinia enterocolitica* (BOLTON, 1997).

A maioria das espécies desse grupo é flagelada em temperatura ambiente e cresce em meios laboratoriais comuns, como ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey, com incubação a 35°C. Sua taxa de crescimento é relativamente lenta em comparação com a maioria dos outros microrganismos (McVey D. S.; Kennedy M.; Chengappa, M. M. 2016).

2.2 Patogenicidade

A doença causada pela infecção por *Yersinia* spp. é chamada de yersiniose. Mamíferos silvestres, aves e animais domésticos podem ser potenciais hospedeiros de *Y. enterocolitica* causando infecções intestinais. Um dos principais sintomas observados em animais silvestres infectados é a gastroenterite aguda. Essa condição se manifesta por meio de sintomas como diarreia, vômitos e desidratação (CORK et al., 1995). Em humanos, os sintomas de gastroenterite causada por *Yersinia* spp. são comumente diarréia, febre, dor de cabeça e dor abdominal intensa, podendo até ser confundidos com apendicite. A infecção é adquirida principalmente através da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de animais ou contato direto com fezes de animais (Tortora, G. J.; Case, C. L.; Funke, B. R. 2016).

Yersinia enterocolitica possui estratégias para iniciar efetivamente a infecção no hospedeiro. Dois elementos envolvidos neste processo são o plasmídeo de virulência (plasmídeo pYV) e o sistema de secreção tipo III (T3SS). Plasmídeos de virulência, como o pYV, são pequenos fragmentos de material genético que carregam genes especializados. No caso da *Y. enterocolitica*, estes genes conferem capacidades específicas relacionadas com a

virulência. Eles são como “pacotes de instruções” genéticos que dão às bactérias a capacidade de causar doenças através da manipulação de seu ambiente (GEMSKI et al., 1980; PORTNOY & FALKOW, 1981).

Além dos plasmídeos, as bactérias também utilizam um sistema de secreção tipo III (T3SS). Este é um mecanismo sofisticado que permite que proteínas efetoras sejam injetadas diretamente nas células hospedeiras. Este sistema atua como uma agulha molecular, permitindo que bactérias do gênero *Yersinia* entre nas células hospedeiras e modifique processos celulares importantes em seu próprio benefício. As proteínas efetoras manipulam os mecanismos de defesa celular, como as respostas imunes e a sinalização celular, promovendo assim a sobrevivência bacteriana e a disseminação dentro do hospedeiro (FÀBREGA & VILA, 2012). Assim, a combinação desses dois elementos, o plasmídeo de virulência e o sistema de secreção tipo III, fornece à *Y. enterocolitica* as ferramentas necessárias para desencadear uma infecção bem-sucedida, evitar as defesas do hospedeiro e estabelecer um ambiente propício à sua replicação e persistência

2.3 Relatos de casos

A presença dessa bactéria em diferentes cenários geográficos e contextos surpreende pela sua capacidade de afetar não apenas animais, mas também humanos. Na Holanda, um cão foi adotado para uma bebê de 1 ano, trazido da Espanha por meio de uma agência de transporte. É válido ressaltar que o animal não passou por período de quarentena antes de ser introduzido no ambiente familiar. Ao chegar, o cão apresentava episódios de diarreia e 3 dias após a introdução do cão no ambiente familiar a criança apresentou os mesmos sintomas, após várias semanas com esse sintoma, foi realizado exames que detectou bactérias enteropatogênicas nas amostras do animal e da criança, revelando *Yersinia enterocolitica* (HETEM et al., 2013).

Esse caso não é o único, pois ao analisarmos a literatura tem-se que em 1976 ocorreu o primeiro surto de *Yersinia enterocolitica* em humanos no Estado de Nova York, levando à hospitalização de 36 crianças, das quais 16 passaram por apendicectomias devido à gravidade da situação. Esse surto foi vinculado ao consumo de leite achocolatado contaminado (BLACK et al; 1978) Uma revisão sobre a detecção de *Yersinia enterocolitica* relata vários surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados (GUPTA, et al., 2015). A Tabela 1 adaptada desta revisão mostra a ocorrência desses surtos em diferentes anos, países e alimentos.

Tabela 1: Surto de yersiniose devido a *Yersinia enterocolitica* relatados em diferentes produtos alimentícios.

Ano	País	Infectados	Alimentos
1976	Estados Unidos	36	Achocolatado
1981	Estados Unidos	239	Leite em pó
1981-1982	Estados Unidos	50	Tofu
1982	Finlândia	26	Comida de cantina
1982	Estados Unidos	16	Broto de feijão
1983-1984	Inglaterra e País de Gales	32	Leite cru
1983	Hungria	8	Brow
1987-1988	Austrália	11	Leite pasteurizado
1988	Suécia	61	Leite e creme
1990	Inglaterra	36	Leite pasteurizado
1997	Estados Unidos	10	Leite pasteurizado
1998	Índia	25	Soro de leite coalhado
2005	Japão	42	Salada mista
2011	Noruega	21	Salada ensacada

FONTE: Adaptado de GUPTA, et al., 2015

Descobertas de diferentes estudos relacionados à presença de *Yersinia enterocolitica* em mamíferos selvagens, destaca-se tanto na Austrália quanto na Alemanha. Um estudo australiano voltado para a investigação de doenças em raposas voadoras de cabeça cinzenta (*Pteropus poliocephalus*), utilizando a técnica de metagenômica detectou na pesquisa uma das cepas da espécie *Yersinia enterocolitica* (HENRY et al., 2018). É sabido que os insetos podem transportar bactérias patogênicas e na Alemanha todas as espécies de morcegos são insetívoras. Diante desse contexto, pesquisadores cultivaram vinte e cinco gêneros bacterianos a partir de morcegos insetívoros, *Yersinia enterocolitica* foi isolada de 2 espécies desses mamíferos (MÜHLDORFER et al., 2010).

Conforme descrito nos relatos apresentados a *Yersinia enterocolitica* pode ser detectada em variados hospedeiros, que vão desde animais de estimação até mamíferos selvagens, isso evidencia um potencial trajeto para a disseminação da doença. É importante reconhecer que à medida que os habitats naturais são convertidos para o desenvolvimento humano, os animais selvagens perdem seus espaços tradicionais, forçando-os a se aproximar de áreas urbanas em busca de alimento e abrigo para se reproduzirem. Em Belo Horizonte, a capital de Minas Gerais, há cerca de 500 praças e 27 parques, além de um sistema de arborização urbana que emprega aproximadamente 80 variedades de espécies vegetais (TOLEDO, 1993). Isso possibilita que diversos animais selvagens, incluindo os morcegos, encontrem na área urbana um habitat propício para sua sobrevivência, esse deslocamento para áreas urbanas aumenta o contato com

animais de companhia e seres humanos, criando condições favoráveis para a disseminação de patógenos como a *Yersinia enterocolitica*.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostragem

No presente estudo, foram selecionadas 144 amostras de tecidos de morcegos provenientes da coleção de mamíferos da Universidade Federal de Lavras (CMUFLA), representando 13% desta, a qual abriga 1.115 espécimes. A escolha dos indivíduos foi aleatória, porém limitada a espécies com comportamento sinantrópico. Todos os animais estavam preservados em álcool absoluto e as amostras de fígado foram coletadas e armazenadas em microtubos, mantidos em um freezer a -20°C até a próxima etapa, que consistiu na extração de DNA.

De 144 amostras, 37 gêneros e 51 espécies de morcegos foram identificadas, sendo 84 machos, 55 fêmeas e 5 não identificadas Tabela 2. Esses animais eram provenientes de 18 localidades: Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito, Campus da UFLA, Valos, Morro II, Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Parque Estadual do Ibitipoca, Complexo da Zilda, Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, Fazenda Lagoa, Mata Triste, Samarco, Parque Estadual do Rio Preto, Fiol 095, Gruta Riscada, Complexo Germano, Gruta do Brega, Gruta Mastodonte, Gruta da Paca. A Tabela 3 mostra o número de amostras pertencente a cada município em cada estado.

Tabela 2: Descrição da distribuição por família, espécie e sexo dos 144 morcegos da Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Lavras utilizados neste estudo.

Família	Espécies	NS	Sexo		
			Macho	Femea	NI
Emballonuridae	<i>Peropteryx kappleri</i>	4	1	3	0
	<i>Peropteryx macrotis</i>	2	0	2	0
	<i>Rhynchonycteris naso</i>	4	1	3	0
Furipteridae	<i>Furipterus horrens</i>	2	1	0	1
Molossidae	<i>Eumops auripendulus</i>	4	2	2	0
	<i>Eumops glaucinus</i>	1	0	1	0

	<i>Eumops perotis</i>	1	0	1	0
	<i>Molossops neglectus</i>	2	2	0	0
	<i>Molossops temminckii</i>	6	2	4	0
	<i>Molossus aztecus</i>	10	4	6	0
	<i>Molossus molossus</i>	4	2	2	0
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	4	2	2	0
	<i>Promops nasutus</i>	2	2	0	0
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	10	5	5	0
Mormoopidae	<i>Pteronotus gymnonotus</i>	3	0	3	0
	<i>Pteronotus personatus</i>	2	0	2	0
Natalidae	<i>Natalus macrourus</i>	3	0	2	1
	<i>Anoura caudifer</i>	2	0	2	0
	<i>Anoura geoffroyi</i>	2	0	2	0
	<i>Artibeus cinereus</i>	2	1	1	0
	<i>Artibeus lituratus</i>	2	1	1	0
	<i>Artibeus obscurus</i>	1	0	1	0
	<i>Artibeus planirostris</i>	2	1	1	0
Phyllostomidae	<i>Chiroderma doriae</i>	1	1	0	0
	<i>Chiroderma villosum</i>	2	1	1	0
	<i>Desmodus rotundus</i>	8	3	5	0
	<i>Diphylla ecaudata</i>	2	2	0	0
	<i>Dryadonycteris capixaba</i>	1	0	1	0
	<i>Glossophaga soricina</i>	4	3	1	0
	<i>Lionycteris spurrelli</i>	2	1	1	0
	<i>Lonchophylla dekeyseri</i>	1	0	1	0

	<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	3	0	3	0
	<i>Micronycteris megalotis</i>	1	0	1	0
	<i>Micronycteris microtis</i>	2	1	1	0
	<i>Micronycteris sanborni</i>	1	1	0	0
	<i>Micronycteris schmidtorum</i>	1	1	0	0
	<i>Mimon bennettii</i>	4	1	3	0
	<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	0	0	1
	<i>Phyllostomus latifolius</i>	2	0	0	2
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1	1	0	0
	<i>Platyrrhinus recifinus</i>	4	1	3	0
	<i>Pygoderma bilabiatum</i>	2	1	1	0
	<i>Rhinophylla pumilio</i>	2	1	1	0
	<i>Sturnira lilium</i>	5	1	4	0
	<i>Tonatia bidens</i>	3	0	3	0
	<i>Trachops cirrhosus</i>	2	0	2	0
	<i>Trinycteris nicefori</i>	1	0	1	0
	<i>Uroderma magirostrum</i>	1	1	0	0
	<i>Vampyressa pusila</i>	2	1	1	0
	<i>Histiotus velatus</i>	4	4	0	0
Vespertilionidae	<i>Lasiurus blossevillii</i>	2	1	1	0
	<i>Lasiurus cinereus</i>	4	1	3	0
Total		144	55	84	5

NS: = número de indivíduos por espécie; NI= não informado.

Tabela 3: Distribuição das amostras por estado e município

Estado	Município	N
Minas Gerais	Lavras	15
	Mariléia	41
	Lima Duarte	9
	Carrancas	9
	Januária	10
	Timóteo	3
	Monte Belo	2
	Canaã dos Carajás	6
	Mariana	3
	Muzambinho	2
	Pains	3
Pará	Minduri	4
	Parauapebas	9
	Ilhéus	6
	Grão Mogol	4
Bahia	Águas Vermelhas	1
	São Gonçalo do Rio Preto	2
	Santa Maria da Vitória	1
	Itabirito	1
Tocantins	Areado	1
	Lavandeira	1
	Aurora do Tocantins	1

	Canaã dos Carajás	6
Pará	Paracatu	1
	Piracicaba	4
São Paulo	São Paulo	1
Não identificado	Amostra sem localidade identificada	1

N: número de amostras

3.2 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit de extração "Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)" seguindo as normas do fabricante. Após a extração, as amostras foram quantificadas para avaliar a qualidade do DNA obtido e armazenadas em um freezer a -20°C até a análise. Um espectrofotômetro (Nanodrop®) foi usado para quantificar as amostras.

3.3 Detecção de *Yersinia* via PCR

A detecção do gene *ail* foi usado para identificação de *Yersinia enterocolitica*, por meio da técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Thoerner, P. et al. (2003): PM-F (5'-TAATGTGTACGCTGCGAG-3') e PM-R (3'-GACGTCTTACTTGCCTG-5'), com um fragmento de PCR de 425bp, foram usados para amplificação do gene. A PCR foi realizada em um volume total de 25 µL. Concentração final de 1X de Buffer IB, dNTP's 200 µM, iniciador F com 100µM, iniciador R com 100µM, Mgcl2 1,5mM, Taq polimerase com 1,25U e DNA a 4ng/µL. Como controle positivo utilizou-se bactéria *Y. enterocolitica* do grupo O:9 (Nº CLIST 3445 - Amostra Padrão YE 383) que foi cedida gentilmente pelos pesquisadores Dr. Ernesto Hofer e Dr^a Deyse Vallim do Instituto Oswaldo Cruz – Manguinhos/RJ ao Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva, coordenado pela Prof.^a Dr^a Elaine M. S. Dorneles.

As amplificações foram conduzidas seguindo o seguinte protocolo: uma etapa inicial de hotstart a 94°C por 3 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos, então foram realizados 30 ciclos de anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e, por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Todos os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen Brasil, São Paulo) corados com brometo de etídeo (0,4 µL), utilizando-se tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8.0). Utilizou o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (KASVI, Brasil). As imagens foram reveladas e registradas em aparelho transluminador (L-PixChemiPhotoDigitizer - Loccus Biotecnologia, Brasil) para análises posteriores.

4. RESULTADOS

Das 144 amostras submetidas ao teste de PCR, 3,47% (5/144) foram identificadas como positivas para *Yersinia enterocolitica*, enquanto 96,52% (139/144) das restantes foram negativas (Imagem 1). A maioria dos animais positivos eram do sexo masculino 60% (3/5) e localizados em diferentes regiões. Os dados epidemiológicos dos animais positivos estão descritos na Tabela 4.

Figura 1: Na eletroforese em gel de agarose a 1,5% revelou a amplificação do produto da reação em cadeia da polimerase de uma amostra de tecidos de morcegos no dia 3 de outubro 2023.

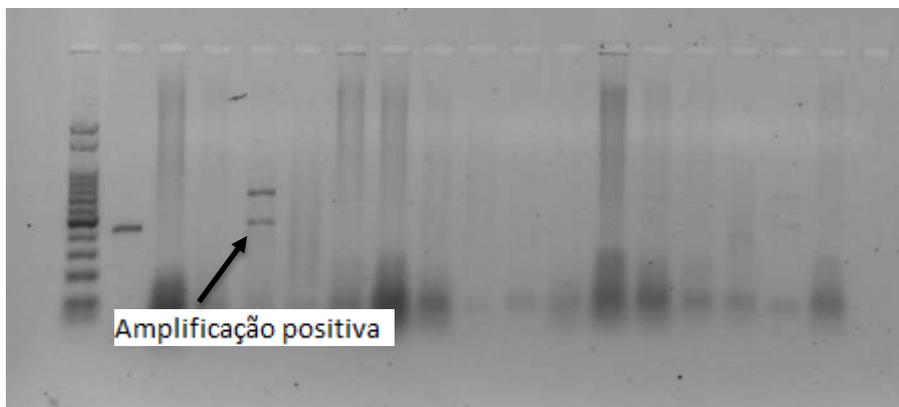


Tabela 4: Dados epidemiológicos das amostras positivas de morcegos.

Espécie	Família	Sexo	Local	Município	Estado
<i>P. gymnonotus</i>	<i>Mormoopi dae</i>	M	Morro II	Parauapebas	Pará
<i>P. bilabiatum</i>	<i>Phyllostomidae</i>	M	Complexo da Zilda	Carrancas	Minas Gerais
<i>M. molossus</i>	<i>Molossidae</i>	F	Parque Estadual do Rio Doce	Marliéria	Minas Gerais
<i>D. rotundus</i>	<i>Phyllostomidae</i>	F	Parque Estadual do Rio Doce	Marliéria	Minas Gerais

<i>M. aztecus</i>	<i>Molossidae</i>	M	Não informado	Minduri	Minas Gerais
-------------------	-------------------	---	---------------	---------	--------------

M: macho; F: fêmea.

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos testes PCR mostraram que a prevalência de *Yersinia enterocolitica* foi de 3,47% entre as 144 amostras analisadas. Isso nos mostra que a maioria dos casos positivos foi observada em animais machos, representando 60% dos casos identificados. Além disso, a distribuição geográfica dos animais positivos abrange múltiplas regiões, indicando uma infecção generalizada. Testes para espécies diferentes, mas resultados positivos para *Y. enterocolitica* no mesmo local, sugerem a possibilidade de transmissão interespecíes. Estas descobertas demonstram que fatores como o sexo e a localização geográfica devem ser tidos em conta na compreensão da epidemiologia desta infecção, e também destacam a necessidade de medidas de prevenção e controle para limitar a propagação da bactéria entre animais de diferentes espécies.

Um estudo realizado no oeste da Geórgia em 2018, relata que um explorador de caverna encontrou morcegos mortos. Destes, os menos decompostos foram selecionados e coletados para análise laboratorial, na identificação foi observada a presença de *Yersinia* em três tecidos intestinais de 11 morcegos, estes três isolados foram identificados com a espécie *Y. enterocolitica*. (IMNADZE et al., 2020). Devido a degradação dos habitats naturais causada pela expansão das áreas rural e urbana, diversas espécies de morcegos descobriram nas cidades um ambiente adequado para encontrar alimento, abrigo e realizar seus processos reprodutivos. Entre 2002 e 2009, um total de 486 morcegos falecidos foram investigados na Alemanha, as carcaças de morcegos eram de 6 regiões geográficas diferentes e foram coletados em ambientes urbanos. Os animais encontrados mortos apresentavam causas individuais como: traumas, infecção viral, bacteriana, parasitária, edema pulmonar e as infecções pelo gênero *Yersinia* foram apontadas como uma das causas de morte de morcegos europeus (MÜHLDORFER et al; 2011).

Em meio a esse cenário de degradação dos habitats naturais uma outra pesquisa científica que investigou a presença de *Yersinia enterocolitica* em morcegos de espécies que habitam construções humanas em diferentes abrigos na região do Campus Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, observou-se uma prevalência um pouco mais elevada que o presente estudo, com 15,2% (11/138) das amostras positivas para *Y. enterocolitica*. Este resultado sugere

que fatores urbanos são favoráveis para refúgio desses animais, podendo contribuir para a transmissão dessa bactéria para outros organismos.

A técnica de PCR demonstrou ser uma ferramenta laboratorial crucial na vigilância epidemiológica da presença de *Yersinia enterocolitica* em morcegos, por meio da análise de amostras de tecidos. Essa abordagem pode ser considerada uma alternativa viável para o monitoramento da contaminação desses animais por *Yersinia*, destacando-se como uma possível ferramenta na fiscalização de questões relacionadas à saúde pública e segurança ambiental. A identificação de 3,47% das amostras no presente estudo como positivas, torna evidente a importância de uma atenção especial para áreas onde os morcegos positivos foram identificados. Considerando que a bactéria é conhecida por causar infecções gastrointestinais em humanos, recomenda-se uma vigilância epidemiológica, para prevenir potenciais riscos à saúde humana

Dados sobre morcegos portadores e disseminadores da bactéria *Yersinia enterocolitica* são escassos. Mostrando a necessidade de estudos adicionais para aprofundar a compreensão da dinâmica de transmissão, identificar possíveis reservatórios e explorar fatores que influenciam a prevalência da bactéria. Além disso, programas de educação pública são cruciais para sensibilizar a população sobre os riscos associados à interação com morcegos e promover práticas seguras de convívio com a fauna selvagem.

6. CONCLUSÃO

Embora apenas 3,47% (5/144) tenham apresentado positividade, a detecção desse patógeno sugere um potencial risco à saúde humana e à segurança ambiental. O monitoramento de patógenos, como a *Yersinia enterocolitica*, em morcegos, é fundamental para avaliar os riscos de transmissão de doenças de animais para humanos. Isso pode ajudar a prevenir surtos e epidemias de doenças zoonóticas garantindo a saúde pública e a segurança dos animais.

7. REFERÊNCIAS

- BLACK, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C., ... & Wakelee, A. M. (1978). **Epidemic Infection by *Yersinia enterocolitica* Due to Contaminated Chocolate Milk** *New England Journal of Medicine*, 298(2), 76-79.
- BOTTONE et al. ***Yersinia enterocolitica*: Revisiting a Persistent Human Pathogen..** *Clin. Microbiol. Newsl.* (2015).
- BOTTONE, E. J. (1997). ***Yersinia enterocolitica*: the charisma continues.** *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 257-276.
- BLACK, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C., ... & Wakelee, A. M. (1978). **Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk.** *New England Journal of Medicine*, 298(2), 76-79.
- Centro de Tecnologia da Informação - UFPEL. (2018). **Isolamento de *Yersinia enterocolitica* de morcegos que habitam construções humanas.** *Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão, UFPEL.* https://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2018/CA_01354.pdf
- CORK, S.C., Marshall, R.B., Madie, P. e Fenwick, S.G. (1995). **The Role of Wild Birds and the Environment in the Epidemiology of *Yersinias* in New Zealand.** . *New Zealand Veterinary Journal*, 43, 169-174.
- de SOUZA, G. R., de OLIVEIRA, D. F., NUNES, T. F., FARIAB, K. C., & de SOUSA, R. F. (2021). **Diversidade de Morcegos (Mammalia: Chiroptera) em uma Mata de Galeria do Cerrado Mato-Grossense.** *Ecologia de Campo*, 92.
- FÀBREGA A, VILA J. ***Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30 (1): 24-32.
- FERREIRA, A. C. R., Vieira, T. M., da Costa Custódio, D. A., Melo, M. N., Gontijo, C. M. F., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2021). **Cross-Sectional Study on *Brucella* spp., *Leptospira* spp., and *Salmonella* spp. in Bats from Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 78, 101692.
- GEMSKI P, LAZARE JR, CASEY T. **Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*.** *Infect Immun* 1980; 27: 682-685.
- GUPTA, V., Gulati, P., Bhagat, N., Dhar, M. S., & Viridi, J. S. (2015). **Detecção de *Yersinia enterocolitica* em Alimentos: uma Visão Geral.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 641-650.
- GRANT, T., Bennett-Wood, V., Robins-Browne, R. M., & Eklund, M. (2008). ***Yersinia enterocolitica*.** In M. P. Doyle, & L. R. Beuchat (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers** (pp. 829–852). ASM Press.
- HAMMERL, J. A. et al. **Properties of Two Broad-Host-Range Phages of *Yersinia enterocolitica* Isolated from Wild Animals.** . *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 2021.

- HETEM, D. J., Pekelharing, M., & Thijsen, S. F. T. (2013). **Probable Transmission of *Yersinia enterocolitica* from a Diarrheic Pet Dog to a 1-Year-Old Infant**. Case Reports, 2013*, bcr2013200046.
- HENRY, R., Galbraith, P., Coutts, S., Prosser, T., Boyce, J., & McCarthy, D. T. (2018). **What's the risk? Identifying potential human pathogens within grey-headed flying foxes faeces**. PLoS One, 13(1), e0191301.
- HUTSON, A.M., Mickleburg, S.P., Racey, P.A. (2001). **Morcegos Microquirópteros: Levantamento Global de Status e Plano de Ação de Conservação**, vol. 56. IUCN.
- IMNADZE, T., Natradze, I., Zhgenti, E., Malania, L., Abazashvili, N., Sidamonidze, K., & Kosoy, M. (2020). **Identificação de uma Nova Cepa de *Yersinia enterocolitica* em Morcegos Associada a uma Mortandade de Morcegos na Geórgia (Cáucaso)**. Microorganisms, 8*(7), 1000.
- KOUBÍNOVÁ, D., Irwin, N., Hulva, P., Koubek, P., & Zima, J. (2013). **Hidden Diversity in Senegalese Bats and Associated Findings in the Systematics of the Vespertilionidae Family**. Frontiers in Zoology, 10, 1-16.
- KUNZ, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., Fleming, T.H. (2011). **Serviços Ecológicos Prestados por Morcegos**. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1223, 1–38.
- McVEY D. S.; Kennedy M.; Chengappa, M. M. (2016). **Veterinary Microbiology**. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- MÜHLDORFER, K., Wibbelt, G., Haensel, J., Riehm, J., & Speck, S. (2010). ***Yersinia* Species Isolated from Bats in Germany** Emerging Infectious Diseases, 16(3), 578.
- QUINN, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E., Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. (2005). **Veterinary Microbiology and Infectious Diseases** . Artmed Editora
- SZENTIVANYI, T., McKee, C., Jones, G., & Foster, J. T. (2023). **Trends in Bacterial Pathogens of Bats: Global Distribution and Knowledge Gaps**. Transboundary and Emerging Diseases, 2023.
- TOLEDO, F.R.N. **Manual para reconhecimento das árvores e arbustos do sistema viário de Belo Horizonte** - MG. 1993. 30f. Monografia (Bacharelado em Botânica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TORTORA, G. J.; Case, C. L.; Funke, B. R. (2016). **Microbiologia**. 12ª Edição. Artmed Editora.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram**. (2001) Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em: 03/12/2023.
- PORTNOY DA FALKOW S. **Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis***. J Bacteriol 1981; 148: 877-883.