



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

## **XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS** **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

### ***Yersinia pestis* em quirópteros de Feira de Santana**

**Amanda Araújo Cedraz Mamede<sup>1</sup>; Aristeu Vieira da Silva<sup>2</sup>**

1. Bolsista – PIBIC/CNPq/UEFS, Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amandamamede2011@gmail.com
2. Orientador, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: aristeuvsilva@uefs.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Zoonoses, Morcego, Bactéria, Peste

## **INTRODUÇÃO**

Os morcegos, com cerca de 182 espécies distribuídas em nove famílias pelo Brasil, desempenham um papel crucial nos ecossistemas, representando 25% dos mamíferos globais (Reis et al., 2000). Além de serem frequentemente associados à transmissão da raiva, uma doença viral letal (Batista et al., 2007), podem ser transmissores de várias zoonoses, como a histoplasmose, e abrigam patógenos, incluindo vírus como *Coronavirus*, *Ebolavirus* e *Hantavirus*, além de bactérias do gênero *Yersinia*. Estas bactérias, especialmente a *Yersinia pseudotuberculosis*, foram detectadas em estudos com morcegos, com até 70% dos indivíduos apresentando evidências de infecção (Childs-Sanford et al., 2009), reforçando a importância de estudos sobre as zoonoses associadas a esses animais.

O interesse no estudo das *Yersinia* em morcegos se intensifica devido à preocupação com o contato desses mamíferos com áreas urbanas, ampliando o risco de transmissão de doenças. A *Yersinia pestis*, responsável pela Peste Negra, é relevante nesse contexto, por persistir em áreas naturais e urbanas, mantendo-se por meio de complexas cadeias epidemiológicas envolvendo mamíferos, pulgas e roedores (Sousa, 2017). Um estudo recente de metagenômica realizado pelo Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública detectou fragmentos de ácidos nucleicos de *Y. pestis* em morcegos da área urbana de Feira de Santana, Bahia, o que impulsionou esta pesquisa. Assim, este estudo busca investigar a presença de *Y. pestis* em morcegos, contribuindo para um melhor entendimento da interação entre a bactéria, esses mamíferos e o ecossistema, o que é fundamental para a saúde pública e a prevenção de potenciais surtos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia empregada neste estudo envolveu uma análise metagenômica com base no protocolo *SMART-9N* (Claro et al., 2023), adaptado para a investigação da presença de *Yersinia pestis* em morcegos coletados na área urbana de Feira de Santana. O DNA foi extraído e purificado utilizando o Kit *Zymo-RCC-5* (*Zymo Research*®), e a reação de PCR foi realizada com o kit *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*, seguindo as

instruções do fabricante. Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram preparados para sequenciamento em um equipamento *MinION*, utilizando kits específicos para a construção da biblioteca. O sequenciamento foi realizado por 48 horas, e os dados gerados foram processados com softwares como *Guppy* e *EPI2ME*, possibilitando a classificação taxonômica com o *Kraken 2*.

As amostras de morcegos mortos foram coletadas em áreas urbanas seguindo um raio pré-determinado, garantindo conformidade com protocolos de biossegurança. Coletaram-se sangue, órgãos, swabs de orofaringe e reto, além de conteúdo gastrointestinal, que foram estocados a -20°C até a extração do DNA. As amostras de tecido foram homogeneizadas e o DNA foi extraído com o kit *Extracta MTTD-P016*, respeitando as orientações do fabricante. O uso de swabs garantiu a obtenção de amostras orofaríngeas e retais, enquanto o DNA dos órgãos foi preservado em *DNA/RNA Shield®*.

Para a detecção da *Yersinia pestis* foi necessário padronizar o protocolo de PCR, utilizando-se controles positivos e negativos para assegurar a confiabilidade dos resultados. A mistura de reação de PCR incluiu oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *cafI*, *pla*, *lcrV* e *irp2*, amplamente reconhecidos na identificação de *Y. pestis*. A amostra de DNA foi adicionada à mistura contendo tampão PCR, MgCl<sub>2</sub>, deoxinucleotídeos e a enzima *Hot Start Taq DNA polimerase*, usando como base o protocolo padronizado por Leal e Almeida (1999).

A seguir, a análise das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3%, permitindo a visualização da amplificação dos genes de interesse. A qualidade das amostras foi avaliada através do uso de corantes específicos e a comparação com um padrão comercial de fragmentos de DNA para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados. Esse procedimento foi fundamental para garantir a integridade do material genético e validar a presença de *Y. pestis* antes do sequenciamento final.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A peste negra, causada pela bactéria *Yersinia pestis*, foi uma das pandemias mais devastadoras da história, ocorrendo entre 1347 e 1351 (Benedictow, 2011) e resultando na morte de cerca de um terço da população europeia. A transmissão ocorre principalmente por pulgas infectadas que se alimentam de roedores, como ratos (Sousa, 2017), e também pode ocorrer por contato com fluidos corporais de animais infectados ou por gotículas respiratórias em casos de peste pneumônica.

Os resultados metagenômicos foram complementados com sequenciamento na plataforma *Krona*, que evidenciou a predominância de diferentes gêneros bacterianos, com destaque para o grupo *Yersiniaceae* nas fezes dos morcegos (Figura 1). A análise detalhada indicou a presença do complexo *Yersinia pseudotuberculosis*, enquanto a Figura 2 confirmou a detecção de fragmentos de DNA de *Yersinia pestis* e *Yersinia similis*. Entre os quatro morcegos coletados, três tiveram os tecidos analisados e o DNA extraído, enquanto o quarto aguardava resultado negativo para raiva antes da extração, conforme o protocolo de segurança do Centro de Controle de Zoonoses de Feira de

Santana. Além de amostras cardíacas, pulmonares e intestinais, também foram coletadas amostras orofaríngeas e retais, todas analisadas molecularmente para detecção de *Y. pestis*.

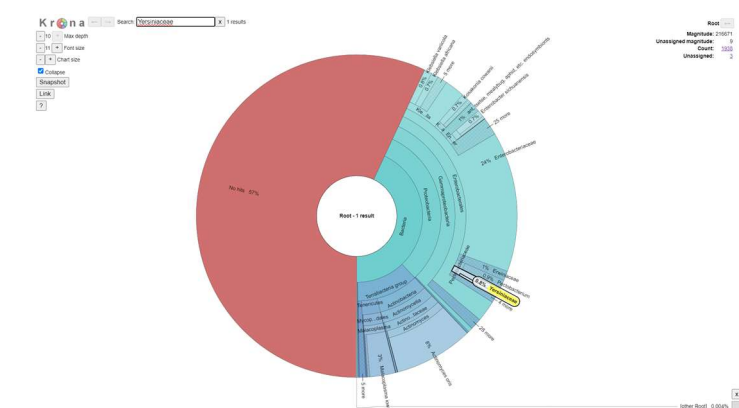


Figura 1. Distribuição dos grupos bacterianos mais abundantes (>1% de reads) identificados a partir do DNA extraído das fezes de *Eumops auripendulus* em Feira de Santana, BA. Os resultados foram obtidos por sequenciamento metagenômico e analisados pelo software Krona, revelando a predominância de diferentes gêneros bacterianos presentes na amostra. Destaque em amarelo para o grupo *Yersiniaceae*.

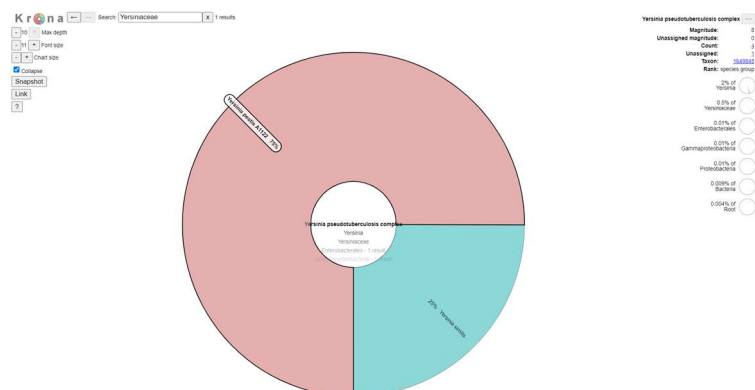


Figura 2. Identificação de DNA de *Yersinia pestis* A1122 e *Yersinia similis* em DNA extraído das fezes de *Eumops auripendulus* em Feira de Santana, BA. Os resultados foram obtidos por sequenciamento metagenômico e analisados pelo software Krona.

Os resultados preliminares obtidos por PCR indicaram a amplificação do gene *cafI* (506 pb), associado ao plasmídeo *pFra*, que codifica o antígeno F1, característico de *Y. pestis*. A eletroforese em gel de agarose revelou a amplificação nos tecidos cardíacos de dois morcegos da espécie *Molossus molossus* (Figura 3). Esse achado é inédito, dado que a presença de *Yersinia* em quirópteros não havia sido documentada anteriormente. No entanto, para confirmação definitiva, será necessário realizar novas PCRs com maior precisão, assegurando a amplificação correta dos genes e material genético suficiente para sequenciamento, visando garantir a identificação de *Y. pestis*.

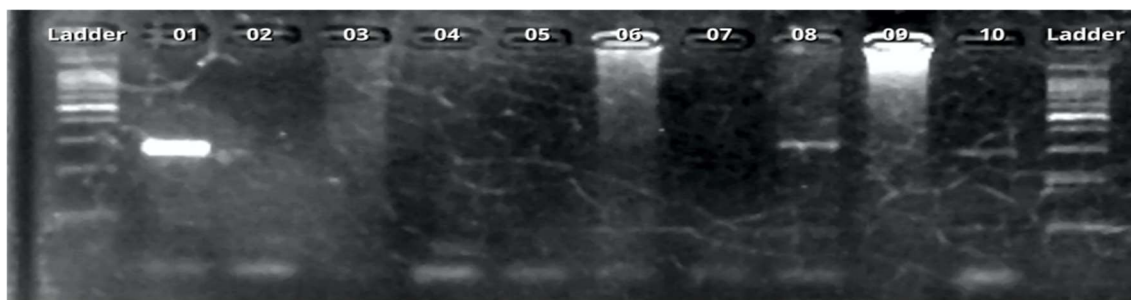


Figura 3. Eletroforese de DNA das amostras de tecidos de músculo, coração, pulmão, fígado, baço, intestino e fezes de morcegos 115, 116 e 198, depositadas na coleção do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública. As amostras foram submetidas a PCR para amplificação dos genes *caf1*, *pla*, *lcrV* (localizados nos plasmídeos pFra, pPst e pYV, respectivamente) e do gene cromossômico *irp2*, visando a detecção de *Yersinia pestis*. Ladder = padrão de peso molecular 100pb; 01 - *Y. pestis*; 02 - água ultra-pura; 03 - músculo; 04 - fezes; 05 - intestino; 06 - fígado e baço; 07 - pulmão; 08 - coração; 09 - água ultra-pura; 10 - *Y. pestis*.

A confirmação da presença de *Yersinia pestis* em quirópteros será um marco significativo, representando o primeiro registro documentado desse patógeno em morcegos no mundo. Esse resultado não apenas abrirá novas linhas de investigação sobre o papel dos morcegos na ecologia de patógenos zoonóticos, mas também terá implicações importantes para a saúde pública e a prevenção de zoonoses. A descoberta contribui para o entendimento da ecologia de *Y. pestis* e ressalta a importância da vigilância em áreas urbanas, onde as interações entre humanos e animais são frequentes, destacando o potencial risco para a disseminação de doenças.

Ademais, a pesquisa ressalta a necessidade de estudos adicionais para a caracterização genética das amostras, com o intuito de avaliar a diversidade e a evolução da *Y. pestis* em populações de morcegos. O conhecimento adquirido pode fornecer subsídios para futuras investigações e para a implementação de estratégias de controle e prevenção de surtos de peste, considerando a interconexão entre saúde ambiental, animal e humana.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram a amplificação de DNA em tecidos cardíacos de dois morcegos, sendo possível a infecção por *Yersinia pestis*. As técnicas de PCR e eletroforese foram essenciais para a detecção e visualização do material genético, possibilitando a identificação preliminar do patógeno.

## REFERÊNCIAS

- BATISTA, H. B. C. R. et al. Raiva: uma breve revisão. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.
- BENEDICTOW, O. J. *La peste negra, 1346-1353: la historia completa*. Ediciones Akal, Móstoles (Madrid), p. 12-57, 2011.
- CHILDS-SANFORD, S. E. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* in a closed colony of Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 40, n. 1, p. 8-14, 2009.
- CLARO, I. M. et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Research*, v. 6, p. 241, 2021. doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2.
- LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, p. 339-342, 1999.
- REIS, L. S. et al. Diversidade de morcegos (Chiroptera, Mammalia) em fragmentos florestais no estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 17, p. 697-704, 2000.
- SOUSA, L. L. F. *Dinâmica de circulação e distribuição da infecção por Yersinia pestis em cães e gatos nos focos de peste do Estado do Ceará*. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.