

# Investigação de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. no trato intestinal de avestruzes (*Struthio camelus*) criados no estado do Rio de Janeiro, Brasil

## Investigation of *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. in ostriches (*Struthio camelus*) intestine from Rio de Janeiro State, Brazil

Carlos Eduardo Ribeiro Coutinho,\* Robson Maia Franco,\*\* Helena Magalhães,\*\*\* Maria Helena Cosendey de Aquino\*\*\*\*

### Resumo

Na estruicultura, pesquisas relacionadas com a prevalência de micro-organismos patogênicos para esses animais e de importância em saúde pública ainda são escassas. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. a partir de 60 amostras de suabes cloacais, provenientes de quatro criatórios de avestruzes e avaliar o perfil de susceptibilidade destes micro-organismos frente aos antimicrobianos. Os micro-organismos dos gêneros *Salmonella*, *Listeria* e *Campylobacter* não foram encontrados nas amostras analisadas. *Pseudomonas aeruginosa* foi isolado a partir de 17 amostras (28,3%), provenientes de animais de diferentes faixas etárias, oriundos dos quatro criatórios investigados. Adicionalmente, *Escherichia coli* foi isolado de 57 amostras (95%), *Klebsiella* spp., de cinco amostras (8,33%), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Enterobacter* spp. de uma amostra (1,66%). Das 17 cepas de *P. aeruginosa* submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, todas (100%) apresentaram sensibilidade à Amicacina e à Ciprofloxacina e todas (100%) foram resistentes ao Sulfametoxazol/Trimetoprim e à Tetraciclina. Foram encontrados cinco perfis diferentes de resistência aos antimicrobianos, indicando uma variação da resistência entre as cepas de *Pseudomonas* isoladas, inclusive em animais do mesmo criatório e mantidos no mesmo piquete.

**Palavras-chave:** avestruz, *Pseudomonas* spp.; *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp; *Listeria* spp.

### Abstract

There has been limited research on the prevalence of ostrich intestinal pathogens and on the role of these animals as foodborne pathogens source. This study was conducted to estimate the frequency of *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. from intestinal swabs of ostriches and to investigate the antibiotic resistance of the isolates. Sixty samples collected from four ostrich farms were examined. *Salmonella*, *Listeria* and *Campylobacter* were not isolated from the samples investigated and *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from 17 (28.3%) samples. Additionally, *Escherichia coli* was isolated from 57 samples, (95%), *Klebsiella* spp. from five (8.33%), and *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Enterobacter* spp. from one sample (1,66%). All *Pseudomonas* isolates were susceptible to Amicacin and Ciprofloxacin, and all of them (100%) were resistant to Trimethoprin/Sulfametox and to Tetracycline. Five antimicrobial resistance profiles were found, showing a resistance diversity among the *Pseudomonas* isolates, even in the same farm and raised at the same pen.

**Keywords:** Ostrich, *Pseudomonas* spp.; *Salmonella* spp.; *Campylobacter* spp.; *Listeria* spp.

### Introdução

Embora a estruicultura seja uma atividade em crescimento no agronegócio nacional como uma alternativa na pecuária, pesquisas relacionadas com a prevalência de micro-

organismos relacionados com a saúde desses animais e à saúde pública, nessas aves, ainda são escassas.

Os problemas relacionados com o trato digestivo são os que mais afetam os plantéis de aves jovens. Na natureza, os

\* Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisa Evandro Chagas. Av. Brasil, n. 4365, Manguinhos. email: cadafa@ig.com.br

\*\* Departamento de Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Veterinária/Universidade Federal Fluminense. email: robsonmf@vm.uff.br

\*\*\* Pesquisadora do Laboratório de Biologia Animal/ PESAGRO-RIO/Alameda São Boaventura n. 770, Niterói, RJ. email: helenanit@yahoo.com.br

\*\*\*\* Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Veterinária /Universidade Federal Fluminense. Autor para correspondência: Rua Vital Brazil Filho, 64. Niterói. Rio de Janeiro. Tel/ Fax 26299534. email: maryhel@uol.com.br

processos para a obtenção da microbiota intestinal ocorrem naturalmente; porém, isto não ocorre na produção avícola moderna e as mortes decorrentes de processos infecciosos representam grandes perdas econômicas (Gabriel et al., 2006).

*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Listeria* spp. estão entre os principais agentes causadores de enfermidades transmitidas por alimentos no homem, além de representarem risco para a sanidade do plantel avícola.

As aves são os principais carreadores de *Salmonella* spp., determinando alta taxa de mortalidade, especialmente em filhotes (Andreatti Filho et al., 2000). De acordo com o Regulamento Técnico para Registro, Fiscalização e Controle Sanitário dos Estabelecimentos de Criação de Ratitas (Brasil, 2003), está previsto o monitoramento sanitário permanente nos estabelecimentos de criação com pesquisa para *Salmonella* Gallinarum e *S. Pullorum*, consideradas de risco para o plantel e *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* consideradas de risco para a saúde pública.

*Campylobacter* spp. além de colonizar o intestino desses animais, também é citado como agente de hepatite, levando à mortalidade em filhotes (Stephens et al., 1998), enquanto *Listeria* spp. pode determinar septicemia, miocardite e áreas necróticas no fígado das aves (Barnes, 1991).

Na estruicultura, mínimas alterações de manejo podem estressar as aves e permitir o surgimento de infecções oportunistas, como ocorre na septicemia e aerossaculite causada por *Pseudomonas aeruginosa* (Marinho et al., 2004; Motta et al., 2008) após colonizar o intestino. A contaminação por *Pseudomonas* spp. também causa grandes prejuízos à indústria de alimentos por seu envolvimento frequente na perda de produtos estocados, pois este agente causa depreciação por alteração do odor e formação de limosidade (Geonaras e Holy, 2000).

Devido ao pouco conhecimento que se tem a respeito dos aspectos que envolvem essa atividade, é necessário que se conheça a microbiota intestinal desses animais, especialmente a patogênica, contribuindo para um aspecto importante no manejo, principalmente no que se refere à utilização de probióticos para evitar a colonização por patógenos através da exclusão competitiva.

Este trabalho teve como objetivo principal verificar a presença de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp e de *Pseudomonas* spp., na microbiota intestinal de avestruzes criados comercialmente no estado do Rio de Janeiro e avaliar a susceptibilidade desses micro-organismos frente aos antimicrobianos.

## Material e métodos

Foram estudados 60 avestruzes de idades e linhagens diferentes (*African Black*, *Blue Neck*, *Red Neck*), divididos em quatro grupos de 15 aves cada, provenientes de quatro criatórios diferentes (A, B, C e D), localizados no estado do Rio de Janeiro. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a idade (inferior ou superior 15 meses). O criatório A era localizado no município de Cachoeiras de Macacu, o B no município de Itaboraí e os criatórios C e D no município de Silva Jardim. Todos os animais recebiam ração específica para a espécie, complementada com alimento

volumoso, eram mantidos em piquetes cercados de terra a céu aberto durante todas as etapas de criação e estavam hígidos no momento da coleta. Não foram administradas vacinas de qualquer tipo nos animais e foram fornecidos probióticos aos filhotes no primeiro dia de vida como parte da rotina do criatório, compostos de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* na concentração de  $3,33 \times 10^6$ . As fezes foram coletadas com o uso de suabes e enviadas ao Laboratório em meio de transporte Cary & Blair (OXOID CM519). Para a pesquisa de *Salmonella* spp., foram utilizadas duas metodologias. As amostras foram diluídas em salina peptonada a 0,1% e conforme a metodologia descrita por Costa e Hofer (1972), foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para enriquecimento. Alíquotas do cultivo foram inoculadas em caldo tetrionato (DIFCO) e posteriormente semeadas em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (OXOID) e ágar Hektoen (OXOID). As colônias suspeitas foram inoculadas em meio CV (Costa e Vernin, 1955) para identificação presuntiva. Paralelamente, conforme Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003 (Brasil 2003), alíquotas foram inoculadas em caldo Selenito Cistina (OXOID) e caldo Rapaport-Vassiliadis (OXOID) e posteriormente semeadas em placas contendo agar Rambach (MERCK) e agar Hektoen (Merk). Colônias suspeitas foram semeadas em meio *Triplix Sugar Iron* (OXOID) e ágar Lisina (MERCK) para identificação presuntiva e posterior identificação bioquímica. Para a pesquisa de *Listeria* spp. foi utilizada a metodologia descrita por Ryser e Donnelly (2001). Amostras homogeneizadas em salina peptonada a 0,1% foram inoculadas em *Modified Listeria Enrichment Broth* (DIFCO) para enriquecimento e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Alíquotas do enriquecimento foram semeadas em ágar MOX (MERCK) suplementado com cicloheximida (200 mg), sulfato de colistina (10 mg), acriflavina (2,5 mg), cefotetan (1,0 mg) e fosfomicina (5,0 mg). Paralelamente, alíquotas do enriquecimento foram semeadas em ágar *Lithium-phenylethanol-moxalactam* (DIFCO) e *Modified McBride* ágar (DIFCO) suplementado com cicloheximide (200 mg). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para observação da morfologia colonial em microscópio estereoscópico e das características morfotintórias das colônias suspeitas para posterior identificação bioquímica. Para o isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., foi utilizada a metodologia descrita por Stern, (1992). Alíquotas de 0,3 mL foram retiradas da solução homogeneizada em salina peptonada a 0,1% e colocadas sobre membrana Millipore (0,65 mm) depositada sobre placas contendo ágar *Brucella* (MERCK) suplementado com mistura antimicrobiana Campylofar (CEFAR) e com 7% de sangue de carneiro. Após remoção da membrana, as placas foram incubadas a 42°C em microaerofilia obtida pelo método da passivação do cobre (Jurgensen, 1981). Após observação das características morfotintórias das colônias suspeitas, foi realizada a identificação presuntiva por meio dos testes da catalase e oxidase para posterior confirmação bioquímica. Para a pesquisa de *Pseudomonas* spp. alíquotas das amostras homogeneizadas em salina peptonada foram semeadas em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (MERCK) e ágar Cetrimide (MERCK) e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas foram inoculadas em meio CV para identificação presuntiva e posterior identificação bioquímica (Costa e Hofer, 1972). A identificação de outras

enterobactérias isoladas nos meios semeados foi feita de acordo com a metodologia descrita por Costa e Hofer (1972). Para o teste de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das cepas de *Pseudomonas* spp., foi utilizado o método de difusão de disco em ágar, segundo recomendações do NCCLS (2003).

## Resultados e discussão

Em nenhuma das amostras analisadas foi evidenciada a presença de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ou *Listeria* spp. Estes resultados coincidem com os de outros autores que também não isolaram estes agentes a partir de avestruzes (Ley et al., 2001; Melville et al., 2004). Nos animais jovens investigados nesse estudo, o não isolamento destes micro-organismos pode ser devido à utilização de probióticos no primeiro dia de vida, o que evita a colonização de patógenos, dificultando a sua detecção por métodos tradicionais (Andreatti Filho et al., 2000; Tellez et al., 2001). Redução significativa na excreção de *Salmonella* Typhimurium foi obtida por Lopes et al., (2007), nos casos de enterites associadas à mortalidade em avestruzes, após administração de bactérias da microbiota entérica de avestruzes para aves recém-nascidas. Não foram encontrados relatos referentes à prevalência de *Listeria* em avestruzes, enquanto a presença de *Campylobacter* foi descrita em estudos relacionados com o trato intestinal desses animais (Oyarzabal et al., 1995; Cuomo et al., 2007).

Do total de 60 amostras analisadas, a partir de 17 (28,3%), foi isolada e identificada *P. aeruginosa*. Dentre essas 17 amostras, 12 (70,58%) foram provenientes do criatório C, que apresentava problemas relacionados com a mortalidade de filhotes na faixa etária entre um e três meses. A água fornecida aos animais não recebia tratamento adequado e segundo Barton, (1996), a água é considerada um dos veículos mais importantes na transmissão desse agente. *P. aeruginosa* é descrita como uma espécie bacteriana frequentemente isolada a partir do conteúdo intestinal de avestruzes (Medeiros, 2003), sendo responsável por quadros de pleuropneumonia necrotizante, septicemia e aerossaculite (Motta et al., 2008; Marinho et al., 2004). Melville et al. (2004) também constataram a presença de *P. aeruginosa* em amostras colhidas a partir da cloaca de filhotes de avestruzes clinicamente saudáveis, o que leva a crer que este agente pode ser componente da microbiota normal do intestino e que, em determinadas circunstâncias, pode desencadear processos infecciosos. Nesse estudo, *Pseudomonas* spp. foi mais prevalente em aves jovens (64,7%) com idade inferior a 15 meses. Entretanto, a sua presença foi detectada também em aves acima de 15 meses (35,3%), sugerindo que este micro-organismo pode ser capaz de persistir neste local e no ambiente por longo período, podendo determinar perdas no criatório. Também foram isoladas *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Enterobacter* spp., cuja distribuição entre os criatórios está representada na Tabela 1.

**Tabela 1:** Micro-organismos isolados a partir de fezes de avestruzes provenientes de criatórios localizados no Estado do Rio de Janeiro

	Criatório A	Criatório B	Criatório C	Criatório D	Total
<i>Enterobacter</i> sp.	-	1	-	-	1
<i>Escherichia coli</i>	11	15	14	14	57
<i>Klebsiella</i> sp.	1	1	1	2	5
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	1	-	1
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	1	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1	12	1	17

No teste de sensibilidade aos antimicrobianos, das 17 cepas de *P. aeruginosa* analisadas, todas (100%) foram sensíveis à Amicacina e à Ciprofloxacina, 16 (94,1%) foram sensíveis à Ceftazidima, 14 (82,3%) foram sensíveis à Gentamicina, 15 (88,2%) foram sensíveis e uma intermediária ao Imipenem e todas (100%) foram resistentes à Sulfametoxazol/Trimetoprim e à Tetraciclina. A resistência da *P. aeruginosa* a alguns dos antimicrobianos utilizados possui importância na produção avícola e na Saúde Pública, pois limita o uso destes produtos em casos de infecções animais e humanas. Outros autores também observaram perfis de resistência semelhantes aos observados neste trabalho (Karlowsky et al., 2003; Pitt et al., 2003; Walker et al., 2002; Kelley et al., 1998). Foram encontrados cinco perfis diferentes de resistência aos antimicrobianos, indicando uma variação da resistência entre as cepas de *Pseudomonas* isoladas, inclusive em animais do mesmo criatório e mantidos no mesmo piquete. No criatório C, foram encontrados quatro perfis diferentes (Tabela 2). Esta variação contribui para a manutenção das cepas resistentes no ambiente, pois os antimicrobianos utilizados na terapêutica podem não ser eficientes para todos os indivíduos em tratamentos coletivos.

**Tabela 2:** Perfis de resistência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fezes de avestruzes frente aos antimicrobianos testados e distribuição entre os criatórios

Antibióticos	Tipos de Perfil				
	1	2	3	4	5
Amicacina	S	S	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S	S	R
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S
Gentamicina	I	S	S	R	S
Imipenem	S	R	S	S	S
Sulfa/Trimetoprim	R	R	R	R	R
Tetraciclina	R	R	R	R	R

  

Distribuição dos perfis entre os criatórios					
Criatório A	2				
Criatório B	1	1			
Criatório C		1	9	1	1
Criatório D					1
Total	1	2	11	2	1

## Conclusões

Em razão da ocorrência de *P. aeruginosa* em animais de diferentes faixas etárias, suspeita-se da colonização persistente desta bactéria no intestino dessas aves. Devido à resistência observada ao Sulfametoxazol/Timetoprim e à Tetraciclina, esses antimicrobianos não são indicados no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* nos criatórios estudados.

## Referências

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA E.N.; RIBEIRO A.R.; KONDO N. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Braz. J. Microbiol.* v. 31, p. 107-112, 2000.

BARNES, H.J. Miscellaneous Bacterial Diseases. In: CALNEK, B.W. (Ed.) *Diseases of Poultry*. 9. ed. Iowa: University Press.USA. 1991 p. 289-290.

BARTON, T.L. Relevance of water quality to broiler and turkey performance. *Poult. Sci.*, v. 75, p. 854-856, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta n. 2, de 21 de fevereiro de 2003. Regulamento Técnico para Registro, Fiscalização e Controle Sanitário dos Estabelecimentos de Incubação de Ovos, de Criação e Alojamento de Ratinos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 de fevereiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 26 de agosto de 2003.

COSTA, G. A.; HOFER. E. *Isolamento e identificação de enterobactérias*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 120 p., 1972.

COSTA, G.A.; VERNIN, C.S. Sobre uma modificação do meio Monteverde. Rio de Janeiro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 55, n. 1, p. 115-120, 1955.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLETT, S.; GUILLOT, J.F. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poult. Sci. J.* v. 62, p. 499-511, 2006.

GEONARAS, I.; HOLY, A. Bacterial counts associated with poultry processing at different sampling times. *J. Basic Microbiol.*, v. 40, p. 343-349, 2000.

JURGENSEN, C.A. Caracterização preliminar a nível de gênero para bactérias anaeróbicas predominantes em material clínico. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v. 17, n. 3, p. 74-77, 1981.

KARLOWSKY, J.A.; DRAGH D.C.; JONES M.E.; THORNSBERRY C.; FRIEDLAND I.R.; SAHM D.F. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. *Antim. Ag. Chemother.*, v. 47, p. 1681-1688, 2003.

KELLEY T.R.; PANCORBO O.C.; MERKA W.C.; BARNHART H.M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. *Poult. Sci.* v. 77, p. 243-247, 1998.

Mais estudos relacionados com a microbiota normal e patogênica de avestruzes devem ser realizados, pois, através do seu conhecimento, podem ser estabelecidas técnicas de manejo mais adequadas, visando a manter a microbiota benéfica e evitando a colonização por micro-organismos patogênicos, o que reduziria as perdas de animais, produtos e, conseqüentemente, o risco à saúde pública.

MARINHO, M.; MEIRELES M.V.; SOUZA A.V.G. Determinação da microflora do trato gastrointestinal de avestruzes (*Struthio camelus*) criados na região noroeste do estado de São Paulo, submetidas à necropsia. *Arq. Inst. de Biol.* v. 71, n. 3, p. 267-271, 2004.

MEDEIROS, A.A.; SHOCKEN-ITURRINO R.P.; PAULILLO A.C.; ÁVILA F.; RONCHI C.P.H. Estudo da microbiota de avestruzes do interior do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, p. 88, 2003.

MELVILLE, P.A.; COGLIATI B.; MANGIATERRA M.B.B.C.D.; PERES M.R.; MOURA S.C.A.; MATSUDA L.; KIM A.; BENITES N.S. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1871-1876, 2004.

NCCLS. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*: approved standard. 8. ed. Wayne, Pennsylvania, 2003.

OYARZABAL O.A.; CONNER D.E.; HOERR F.J. Incidence of *Campylobacter* in the intestine of avian species in Alabama. *Avian Dis.*, v. 39, p. 147-151, 1995.

PITT, T.L.; SPARROW M.; WARNER M.; STEFANIDOU M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax*, v. 58, p. 794-796, 2003.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: Downes. F.P. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological enumeration of foods*. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p. 343-356.

STPHES, C.P.; ON, S.L.W.; GIBSON, J.A. An outbreak of infections hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Vet. Microbiol.*, v. 61, p. 183-190, 1998.

STERN, N. J.; PATTON, C.M.; DOYLE, M. P.; PARK, C. E.; MC CARDELL, A. *Campylobacter*. In: Vanderzant, c.; Splittstoesser, O.F. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 475-489, 1992.

TELLEZ, G.; PETRONE V.M.; ESCORCIA M.; MORISHITA T.Y.; COBB C.W.; VILLASEÑOR L. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Heidelberg-Specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J. Food Prot.* v. 64, n. 3, p. 287-291, 2001.

WALKER, S.E.; SANDER J.E.; CLINE J.L.; HELTON J.S. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with mortality in broiler chicks. *Avian Dis.*, v. 46, p. 1045-1050, 2002.