

## ***Campylobacter* TERMOFÍLICOS EM OVOS E GALINHAS POEDEIRAS DE VIDA LIVRE**

**LAÍS ABREU ANASTÁCIO<sup>1</sup>**; **TASSIANA RAMIRES**; **NATALIE RAUBER KLEINUBING**; **ISABELA SCHNEID KRONING<sup>2</sup>**; **WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – laisabre@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com; natalierk10@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, houve uma mudança social quanto ao bem-estar animal, levando ao aumento da produção e procura por produtos mais sustentáveis, como ovos e carnes de aves de vida livre, sem o uso do sistema de confinamento (CASTELLINI, et al., 2008; AVERÓS, et al., 2013). Nos sistemas alternativos de criação, as aves são criadas de forma livre, com acesso a outros ambientes, animais e insetos, tornando-as, porém, mais suscetíveis à contaminação, uma vez que entram em contato com diversos vetores carreadores de patógenos (COLLE, et al., 2008).

Assim, a segurança dos alimentos tem sido debatida em todo o mundo, visto que além do entrave econômico e mercadológico, aos quais os produtores de alimentos são submetidos (KEIICHIRO et al., 2015), as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são um problema de saúde pública (WHO, 2015; HALD et al., 2016). Desde 2005, campilobacteriose tem sido a zoonose mais comumente relatada na União Europeia, representando quase 70% de todos os casos notificados (EFSA, 2018).

No que diz respeito à etiologia, campilobacteriose é causada, em 80 a 90% dos casos, pela espécie bacteriana *Campylobacter jejuni*, pertencente ao grupo *Campylobacter* termofílicos (SzcZEPANSKA et al., 2015). Tais micro-organismos estão amplamente distribuídos entre os animais de sangue quente, porém, as aves são consideradas o principal reservatório dessa bactéria, uma vez que sua temperatura corporal coincide com a temperatura de 42 °C, considerada ótima para a multiplicação do patógeno (HALD et al., 2015; WHO, 2018). O consumo de carne de frango crua ou malcozida, bem como seu preparo de forma inadequada, são considerados a principal forma de infecção e contaminação de utensílios e outros alimentos (SKARP, et al., 2016).

Os principais sintomas de campilobacteriose são diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e vômitos. Tais manifestações duram cerca de 7 dias, porém, pode haver complicações pós-infecção, como artrite reativa e a Síndrome de Guillain-Barré, caracterizada por promover paralisia muscular, podendo resultar em disfunção respiratória e morte. Apesar de geralmente ser autolimitante, em casos de infecção sistêmica ou em pacientes imunocomprometidos, é necessária a intervenção com terapia antimicrobiana (SLKARP, 2016; WHO, 2018).

A campilobacteriose é frequentemente associada a frangos de corte (HALD et al., 2015), porém, estudos relatam a contaminação de ovos e galinhas poedeiras de vida livre por *Campylobacter* termofílicos (MESSELHÄUSSER et al., 2011). Sabendo da importância do patógeno para a saúde pública e da crescente procura por produtos que garantam o bem-estar animal (FRASER, 2008), o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *Campylobacter* termofílicos em

ovos e em galinhas poedeiras de vida livre em propriedades da região do município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

## 2. METODOLOGIA

Foram avaliadas sete propriedades rurais com criações de galinhas poedeiras de vida livre na região de Pelotas, Rio Grande do Sul. Em cada propriedade foram amostrados 6 *pools* de swab de cloaca (cada *pool* representativo de 3 galinhas) e 1 ovo, sendo amostradas a casca, a gema e a clara de cada ovo, totalizando 63 amostras, 9 de cada propriedade.

A amostragem da cloaca foi realizada através de swab esterilizado e foi utilizado o meio de transporte AMIES (Absorve®), a fim de garantir a viabilidade bacteriana. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DCTA/FAEM/UFPel, em caixas refrigeradas, onde foram realizadas as análises microbiológicas. Para a amostragem dos ovos foram coletados 5 mL de clara e 5 mL de gema de cada ovo, enquanto amostras da casca foram coletadas com uso de swabs esterilizados e umedecidos em caldo Bolton (Oxoid®).

O isolamento e a identificação fenotípica de *Campylobacter* termofílicos foram realizados de acordo com a metodologia recomendada pela a ISO 10272-1 (*International Organization for Standardization*). Tanto os swabs da cloaca quanto os da casca foram transferidos para tubos de ensaio contendo, respectivamente, 15 e 45 mL de caldo Bolton (Oxoid®) suplementado e acrescido de 5% de sangue equino desfibrinado e lisado. Além disso, foram transferidos, separadamente, 5 mL da clara e 5 mL da gema, de cada ovo, para tubos esterilizados contendo 45 mL de caldo Bolton (Oxoid®) suplementado e acrescido de 5% de sangue equino desfibrinado e lisado.

Todos os tubos foram homogeneizados e incubados a 42 °C por 24 horas em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>). Ao final desse período, uma alíquota de cada amostra foi inoculada ágar Preston (Oxoid®) e ágar mCCD (Oxoid®), e incubados a 42 °C em microaerofilia, por 48 horas. As colônias com morfologia típica foram selecionadas e inoculadas em ágar sangue nº 2 (Accumedia®), acrescido de sangue equino desfibrinado e lisado, e incubadas a 42 °C por 24 horas. Em seguida foram inoculadas em caldo Brucella (Accumedia®) para a extração de DNA, conforme o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), e posterior confirmação de gênero pela técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR), segundo JOSEFSEN et al. (2004).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as propriedades avaliadas houve a presença de *Campylobacter* termofílicos, como mostram os resultados expostos na Tabela 1. As propriedade “A” e “D” apresentaram o maior percentual de amostras positivas, enquanto a propriedade C, o menor.

Não foi verificada a presença do patógeno nas amostras da gema ou da clara. Quanto à casca, as propriedades “A” e “D” apresentaram presença de *Campylobacter* termofílicos, correspondendo a 28,5% dos ovos avaliados.

Os resultados obtidos da amostragem dos ovos são semelhantes a outros estudos realizados anteriormente. JONES et al. (2012) avaliaram ovos de galinhas poedeiras de vida livre na Carolina do Norte, Estados Unidos da América. Os autores encontraram 12,5% (2/16) das amostras de casca dos ovos com presença de *Campylobacter* termofílicos e, além disso, não encontraram

resultado positivo ao avaliar a clara e a gema dos ovos. Já JONAIIDI-JAFARI et al. (2016) pesquisaram, no Irã, a contaminação de ovos de galinhas poedeiras de criação industrial pelos mesmos patógenos. Os autores obtiveram 7% (7/100), 4% (4/100) e 2% (2/100) de *Campylobacter* termofílicos na casca, clara e na gema dos ovos, respectivamente.

Outro estudo realizado em Oxford, Inglaterra, avaliou amostras de *swabs* de cloaca de galinhas de vida livre, encontrando 96% (24/25) das amostras positivas (COLLES et al., 2010). Já TORRALBO et al. (2015) demonstraram menor incidência de *Campylobacter* termofílicos isolados da cloaca de frangos em criação industrial. Esses autores relatam a presença do patógeno em 55,2% (53/96) das amostras.

**Tabela 1.** Isolamento de *Campylobacter* termofílicos em galinhas poedeiras de vida livre e de ovos em diferentes meios de cultivos

| Propriedades | Amostras positivas (%) | Isolamento em diferentes ágar |         | Nº total de isolados por propriedade |
|--------------|------------------------|-------------------------------|---------|--------------------------------------|
|              |                        | mCCD                          | Preston |                                      |
| A            | 7 (77,7%)              | 3                             | 7       | 10                                   |
| B            | 3 (33,3 %)             | 3                             | 1       | 4                                    |
| C            | 1 (1,11%)              | 1                             | 1       | 2                                    |
| D            | 7 (77,7%)              | 4                             | 7       | 11                                   |
| E            | 3 (33,3%)              | 1                             | 3       | 4                                    |
| F            | 6 (66,6%)              | 6                             | 6       | 12                                   |
| G            | 3 (33,3%)              | 3                             | 3       | 6                                    |

A presença do patógeno, tanto nas aves de vida livre, quanto na casca dos ovos desses animais apresenta relevância, principalmente no que diz respeito à contaminação cruzada com a ave ou com os ovos e outros alimentos e utensílios que não passarão por tratamentos térmicos (SKARP, et al., 2016). Além disso, o fato de todas as propriedades apresentarem amostras positivas demonstra contaminação persistente na região. Isso deve-se, provavelmente, a rápida disseminação de *Campylobacter* termofílicos nos pássaros e outros vetores (BATTERSBY, et al., 2016). Esses animais transitam de uma propriedade para outra, levando a contaminação e perpetuando a presença do patógeno no ambiente (COLE, et al., 2008).

#### 4. CONCLUSÕES

Todas as propriedades amostradas apresentaram ao menos uma amostra positiva para *Campylobacter* termofílicos, o que evidencia a presença do patógeno em galinhas de vida livre na região. Os resultados tornam-se importantes à medida que há uma crescente busca por produtos que são produzidos dentro dos preceitos de bem-estar animal, bem como pela possível contaminação cruzada com outros alimentos. Ademais, ressalta-se a importância de mais estudos sobre o assunto, a fim de identificar a espécie mais prevalente nas amostras, bem como avaliar a diversidade genética entre esses isolados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Averós, et al. The effect of steps to promote higher levels of farm animal welfare across the EU. Societal versus animal scientists' perceptions of animal welfare. **Animals**, Basel, v. 3, n. 3, p. 786-807, 2013.

Battersby, et al. The pattern and sources of *Campylobacter* on broiler farms. **J. Appl. Microbiol.** 120, 1108e1118, 2016.

Castellini et al. Qualitative attributes and consumer perception of organic and free-range poultry meat. **World's Poultry Science Journal**, 64, 500 e 512. 2008.

Colles, et al. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. **Environmental Microbiology**, 10, 2042 e 2050. 2008.

Colles et al. Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. **International Journal of Food Microbiology** 137 (2010) 259–264. 2010.

EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.

Fraser, D. **Understanding Animal Welfare: the Science in Its Cultural Context**, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2008.

Hald, et al. **World Health Organization estimates of the relative contributions of food to the burden of disease due to selected foodborne hazards: A structured expert elicitation**. PloS One, 11(1) e 0145839, 2016

Jonaidi-Jafari et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from the avian eggs. **Food Control** 70, 35 e 40, 2016

Jones et al. Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. **Poultry Science**, 91(5), 1195–1202, 2012.

Josefsen et al. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant *campylobacters*: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.39-48, 2004.

Keiichiro et al. Food safety standards and international trade: The impact on developing countries' export performance. **Food safety, market organization, trade and development** (pp. 151–166), 2015.

Messelhäusser et al. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. on eggshells: a missing link for food-borne infections? **Appl. and Environ. Microbiol.** 77:3896-3897, 2017.

Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York v.1, Chapter 6, Protocol 7, 2001.

Skarp, et al. Campylobacteriosis: the role of poultry meat **Clinical Microbiology and Infection**, Volume 22 Number 2, 2016.

Szczepanska et al. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in White stork Ciconia. **Foodborne Pathogens and Disease**, Ciconia in Poland, v. 12, p. 24-31, 2015.

Torralbo, et al. Higher resistance of *Campylobacter coli* compared to *Campylobacter jejuni* at chicken slaughterhouse. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 39. 47–52, 2015

World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 (No. 9789241565165). **World Health Organization**, 2015.