

# Veiculação de *Campylobacter* spp. através de carne e miúdos de frangos comercializados no estado do Rio de Janeiro, Brasil

## Transmission of *Campylobacter* spp. through chicken meat and organs sold in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Thais Martins Campos<sup>1\*</sup>

Graziele da Silva Mendes<sup>1</sup>

Sheila da Silva Duque<sup>1</sup>

Wagner Thadeu Cardoso Esteves<sup>1</sup>

Jacqueline Darc da Silva Thomé<sup>1</sup>

Ana Luzia Lauria Filgueiras<sup>1</sup>

### RESUMO

O consumo da carne de frango é comum no Brasil por ser um alimento proteico de alto valor biológico e baixo custo, sendo acessível a toda população. Uma causa comum de infecções alimentares tem sido a ingestão de produtos avícolas contaminados, crus ou insuficientemente cozidos, fazendo da contaminação de cortes de frango fontes potenciais de *Campylobacter* spp. para o homem. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Campylobacter* e verificar a possível veiculação da campilobacteriose através de cortes e miúdos de frangos resfriados e comercializados para consumo em supermercados de grande porte no estado do Rio de Janeiro. Para isso, foram coletadas 40 amostras resfriadas de frango, das quais 19 foram embaladas pela indústria e 21 manipuladas pelos supermercados, submetendo-as a três metodologias distintas denominadas: *in natura*, enriquecimento e incubação da água de lavagem. Os resultados obtidos revelaram a presença de espécies de *Campylobacter* zoonóticas resistentes a antimicrobianos em cortes de frango comercializados para consumo humano, indicando que pedaços e miúdos de frango crus ou insuficientemente cozidos são fontes potenciais de campilobacteriose para a população.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Campylobacter* spp.; Frangos comercializados; Microbiologia de alimentos; Saúde pública; Doenças transmitidas por alimentos

### ABSTRACT

The consumption of chicken meat is common in Brazil because this protein-rich food is low cost, has high nutritional value, and is accessible to the entire population. A common cause of foodborne illness has been the ingestion of contaminated, raw, or undercooked poultry products, making contaminated chicken meat a potential source of *Campylobacter* spp. to humans. The objective of this study was to detect the presence of *Campylobacter* and assess the potential transmission of campylobacteriosis through refrigerated chicken meat and organs sold for consumption in large supermarkets in the state of Rio de Janeiro. For this purpose, 40 samples of refrigerated chicken were collected; 19 of these were industrially packed and 21 were manipulated in the supermarkets. The samples were subjected to analysis using three different methodologies: *in natura*, by enrichment, and by incubation of the rinse water. The results revealed the presence of zoonotic, antimicrobial-resistant *Campylobacter* species in chicken meat marketed for human consumption, indicating that raw or undercooked chicken pieces and organs are potential sources of human campylobacteriosis.

**KEYWORDS:** *Campylobacter* spp.; Chickens; Food microbiology; Public health; Foodborne diseases

<sup>1</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: thmcampos@gmail.com

Recebido: 21 ago 2014

Aprovado: 11 dez 2014



## INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um grande problema de saúde pública no mundo, especialmente em países industrializados, onde espécies de *Campylobacter* têm sido responsabilizadas como um dos mais importantes agentes etiológicos dessas enteropatias<sup>1</sup>.

Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que as doenças veiculadas pelo consumo de alimentos e aquelas veiculadas pela água matam 1,8 milhões de pessoas anualmente<sup>2</sup>.

A campilobacteriose, causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, é uma das principais doenças bacterianas transmitidas por alimentos em diversos países, alguns dos quais notificam números superiores aos casos de salmonelose<sup>3</sup>.

A gastroenterite decorrente da infecção por *Campylobacter* é autolimitada, causando diarreia, dor abdominal e febre, com curso de 5 a 7 dias. A doença geralmente se manifesta de 2 a 5 dias após a ingestão de água ou alimentos contaminados. Na maioria das vezes, não é necessário o uso de antibióticos para o tratamento da infecção. No entanto, quando os sintomas são severos ou prolongados, o uso de eritromicina (macrolídeos) reduz o tempo de eliminação dessas bactérias pelas fezes<sup>4</sup>.

A ocorrência de complicações é rara, entretanto esses casos podem desencadear sepse; a síndrome de Guillain-Barré (GBS); a síndrome de Miller Fisher, uma variante da GBS; e a síndrome de Reiter, caracterizada pela ocorrência de artrite reativa<sup>5</sup>.

As principais causas de campilobacteriose estão associadas não só ao consumo da carne de frango contaminada e inadequadamente cozida, como também a práticas incorretas de manipulação de alimentos na cozinha doméstica, gerando contaminação cruzada com outros alimentos consumidos crus, como as saladas<sup>6</sup>.

Sabe-se que *Campylobacter* spp. são capazes de sobreviver por mais de 1 hora nas bancadas e em panos de cozinha, sendo possível contaminar outros alimentos que entrem em contato com estas superfícies<sup>7</sup>.

Na detecção de *Campylobacter* em alimentos, geralmente é encontrado um baixo número de células, principalmente se este alimento for congelado. Por outro lado, como a sua dose infectante é muito baixa, sendo necessárias apenas 500 células para que ocorra a infecção, a carne de frango congelada pode ser veículo de transmissão da campilobacteriose<sup>8</sup>.

A prevalência dessa doença em humanos vem aumentando, sendo considerada uma das causas mais frequentes de infecção de origem alimentar, se tornando uma preocupação para a saúde pública. Porém, infelizmente, o Brasil ainda não possui legislação específica para detecção de *Campylobacter* em alimentos.

Em 2010, a produção brasileira de frangos foi de mais de 12 milhões de toneladas, sendo desse total 69% para o consumo interno e 31% para o externo. De acordo com esses dados, o Brasil alcançou o posto de segundo maior produtor mundial de frangos<sup>9</sup>.

A importância do estudo da contaminação da carne de frango é ressaltada por esta ser uma importante fonte de proteína de alta qualidade, rica em aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais, sendo consumida em larga escala no Brasil e em todo o mundo. Além do seu sabor agradável, sua preparação exige pouco tempo e é um alimento economicamente acessível a toda população, uma vez que é uma das carnes de mais baixo custo.

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Campylobacter* e verificar a possível veiculação da campilobacteriose através de cortes e miúdos de frangos resfriados e comercializados para consumo, em supermercados de grande porte no estado do Rio de Janeiro.

## METODOLOGIA

Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira realizada em janeiro de 2010, no verão, e a segunda realizada em julho de 2011, no inverno, em cinco estabelecimentos comerciais de grande porte, nos municípios de Duque de Caxias e Rio de Janeiro, ambos no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Cada coleta foi constituída de vinte amostras resfriadas de frango, totalizando quarenta amostras, sendo: 10 coxas, 10 asas, 10 fígados e 10 moelas. Destas, vinte e uma foram manipuladas nas próprias redes de supermercados e dezoito estavam na embalagem original (bandejas de isopor) proveniente da indústria.

Os supermercados foram denominados A, B, C, D e E, sendo A localizado no município de Duque de Caxias e B, C, D e E localizados no município do Rio de Janeiro, ambos no Estado do Rio de Janeiro.

As amostras coletadas foram processadas no Setor de *Campylobacter*, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO), situado no IOC/ FIOCRUZ/RJ. O processamento sempre foi realizado no mesmo dia da coleta.

Em cada coleta, as amostras foram lavadas em 100 mL de água peptonada estéril, com fricção de toda superfície durante um minuto, sendo submetidas em seguida a três metodologias distintas (Figura 1).

**1ª “in natura”** - Foi realizada a semeadura direta em placas de Ágar Colúmbia (Difco) acrescido de carvão ativado (0,4 g%), adicionado de solução FBP (Sulfato Ferroso + Bissulfito de Sódio + Piruvato de Sódio, 5 mL) e solução de antimicrobianos (0,5 mL)<sup>10</sup>.

A solução de antimicrobianos utilizada nas três metodologias foi composta pelas substâncias: cefalotina (Sigma), lactato de trimetoprim (Roche), vancomicina (Sigma), acti-dione (Upjohn) e colistina (Sigma).

**2ª “enriquecimento”** - Consistiu na adição da água de lavagem da amostra (25 mL) ao Caldo Brucella (225 mL) acrescido de sangue estéril desfibrinado de carneiro (12,5 mL), FBP (12,5 mL) e solução de antimicrobianos (1,25 mL) dentro de balões, os quais

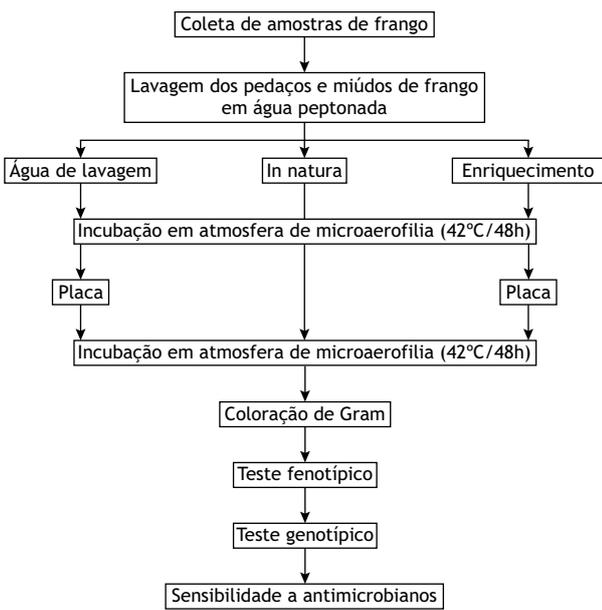


Figura 1. Fluxograma resumido da metodologia utilizada para o isolamento de *Campylobacter* na amostragem e para a caracterização dos isolados.

foram incubados em microaerofilia. Após o período de incubação, foram retirados 100 µL para a semeadura em placas de Ágar Colúmbia, acrescido de carvão ativado, FBP e solução de antimicrobianos, como descrito anteriormente.

**3ª “incubação da água de lavagem”** - Uma alíquota da água de lavagem (3 mL) foi transferida para tubos de ensaio, incubados em microaerofilia. Posteriormente, 100 µL foram semeados em placas contendo Ágar Colúmbia acrescido de carvão ativado, FBP e da solução de antimicrobianos.

Todas as placas, balões e tubos foram incubados a 42°C, em atmosfera de microaerofilia, e após 48 horas foi confirmada a morfologia celular típica de *Campylobacter* nas colônias suspeitas, através da coloração de Gram<sup>10</sup>.

Para a biotipificação das amostras, foi pesquisada a presença da enzima desoxirribonuclease (DNase), utilizando-se o meio para teste de DNase (Difco). Foram feitos “spots” das culturas a serem testadas no meio, depois incubado a 37°C por 48h, em atmosfera de microaerofilia. A interpretação dos resultados levou em consideração a presença ou ausência de um halo de tonalidade rósea, ao redor do crescimento. Nesse teste, utilizou-se uma cepa de *Staphylococcus aureus* como controle positivo.

Para caracterização fenotípica de *C. coli* e *C. jejuni*, foi realizado o teste de hidrólise do hipurato de sódio, pois *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o hipurato de sódio, enquanto que *C. coli* e as outras espécies do gênero *Campylobacter*, não são capazes<sup>11</sup>.

Para a identificação molecular dos isolados, realizou-se a extração do DNA usando Tiocianato de Guanidina<sup>12</sup>. A diferenciação simultânea de *C. coli* e *C. jejuni* foi realizada pela Multiplex-PCR, utilizando os iniciadores C1 (5'-CAAATAAG TTA GAG GTA GAA TGT-3')

e C4 (5'-GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T-3') para amplificação de um fragmento de 160 pb presente em *C. jejuni* e os iniciadores Pg3 (5'-GAA CTT GAA CCG ATT TG-3') e Pg50 (5'-ATG GGA TTT CGT ATT AAC-3') para amplificar regiões conservadas do gene *flaA* (460 pb) presentes em *C. jejuni* e *C. coli*.<sup>13-14</sup>.

O volume final em cada tubo de reação de amplificação foi de 50 µL, composto por 5 µL de DNA bacteriano, 20 picomoles de C1 e de C4, 40 picomoles de Pg3 e Pg50 e pelos seguintes reagentes: 10 mM de Tris-HCL, 50 mM de KC, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 5,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, além de 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase. As amostras CCAMP 419 (*C. jejuni*) e CCAMP 1003 (*C. coli*), cedidas pela Coleção de *Campylobacter* (Fiocruz-CCAMP), foram utilizadas como controles em todas as reações de amplificação.

Os microtubos contendo os componentes da reação foram amplificados no termociclador Mastercycler PRO (Eppendorf), utilizando a seguinte programação: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de amplificação, cada qual constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais 1 ciclo de extensão final do iniciador a 72°C por 7 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR foram mantidos a -20°C, até a realização da eletroforese.

A visualização dos produtos amplificados pela Multiplex-PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1% e utilizando o tampão de corrida TBE 0,5 X. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

Para a confirmação da espécie *C. jejuni*, também foi empregada a técnica de PCR para detecção do gene *hip*, codificante da enzima hipuricase, característica da espécie *C. jejuni*. As estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas tiveram seu DNA extraído, conforme descrito anteriormente, o qual foi submetido à amplificação pela PCR utilizando-se o par de iniciadores Hip400F (5'- GAA GAG GGT TTG GGT GGT-3') e Hip1134R (5'- AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3') da região conservada do gene *hip*, que corresponde a um fragmento de 735 pb<sup>15</sup>.

Para o volume final de reação de 25 µL, foi empregado tampão PCR 10 X, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada *primer* (HIP400F e HIP1134R), 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5 µL do DNA extraído. No termociclador, o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto; seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Como controle positivo, foi utilizada a estirpe padrão de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

A análise do produto amplificado do gene *hip* foi realizada por eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

Realizou-se a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana através da técnica de difusão de discos. Uma suspensão densa do crescimento de 48 horas de cada cultura (tubo 3 da escala de McFarland, aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/mL), preparada em um tubo contendo 1 mL de solução salina estéril, foi semeada por induto contínuo, em placas



de Agar Müeller Hinton (Difco), acrescido de 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro e de 5% da solução de FBP. A seguir, foram depositados discos dos fármacos comumente utilizados na clínica, fabricados pela Oxoid: ácido nalidíxico (NA - 30 µg), ampicilina (AMP - 10 µg), cefalotina (KF - 30 µg), ceftriaxona (CRO - 30 µg), ciprofloxacina (CIP - 5 µg), cloranfenicol (C - 30 µg), eritromicina (E - 10 µg), gentamicina (CN - 10 µg), ceftiofina (FOX - 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT - 25 µg), tetraciclina (TE - 30 µg) e imipenem (IPM - 10 µg). Após incubação de 48 horas a 37°C, em atmosfera de microaerofilia, gerada por envelope de microaerofilia (Oxoid), foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de sensibilidade.

Como padrões para os valores de sensibilidade e/ou resistência, utilizou-se aqueles estabelecidos pelo manual CLSI para bactérias Gram-negativas<sup>16</sup>, por não haver padrões especificamente estabelecidos para membros da família *Campylobacteraceae*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira coleta, foi detectado *Campylobacter* spp. em 70% das amostras manipuladas nas próprias redes de supermercados e em 100% das amostras embaladas em bandejas provenientes da indústria avícola. Já na segunda coleta, houve positividade em 27,3% das amostras manipuladas e em 44,4% das embaladas. Com base nesses resultados, verifica-se que das 40 amostras compostas por pedaços e miúdos de frango resfriados analisados, 24 estavam contaminadas por *Campylobacter* spp., representando 60% da amostra total. Desse total de contaminação, 25% correspondem ao material manipulado e 35% ao material embalado (Tabela 1).

As amostras manipuladas, assim como as embaladas, estavam contaminadas por *Campylobacter* spp., provavelmente em decorrência das condições precárias de higiene e manipulação das carcaças e vísceras em abatedouros. Entretanto, o maior percentual de contaminação nos pedaços e miúdos de frangos embalados industrialmente pode ser explicado por estes terem um menor contato com o oxigênio atmosférico, propiciando um melhor ambiente para multiplicação de *Campylobacter* spp., uma vez que estes microrganismos são microaerófilos.

Embora o número de estudos envolvendo a presença de *Campylobacter* em cortes de frango no Brasil esteja aumentando com o passar dos anos, a legislação brasileira que determina os padrões microbiológicos para alimentos, Resolução RDC nº 12 de

02 de janeiro de 2001, não contempla *Campylobacter* spp. como critério microbiológico<sup>17</sup>.

Partindo desta realidade, fica visível a necessidade de ampliação dos estudos na área de microbiologia dos alimentos com ênfase em *Campylobacter*, para melhor análise da ocorrência deste patógeno em avicultura e seus riscos à saúde pública.

Na execução deste trabalho, também foi observado que temperaturas mais elevadas, no verão, coincidem com maiores taxas de isolamento deste patógeno, fato que está de acordo com dados relatados na literatura<sup>18,19</sup>.

Houve diferença de contaminação entre os supermercados pesquisados, sendo detectada a presença de *Campylobacter* em 75% das amostras do supermercado D; 62,5% daquelas oriundas dos supermercados A, C e E; e em 37,5% do supermercado B (Tabela 1). Sendo assim, a diferença de contaminação entre os supermercados, que se localizam na mesma região geográfica, sugere falhas em itens específicos dos estabelecimentos, como a temperatura de armazenamento, período de armazenamento e contaminação cruzada através de equipamentos, utensílios e superfícies, indicando haver a necessidade de implementação da gestão da qualidade sanitária nestes estabelecimentos.

Em relação aos cortes e miúdos de frango estudados, observa-se que o microrganismo esteve presente em muitos destes, com maior prevalência para o fígado, seguido da moela e da asa e com menor contaminação encontrada na coxa.

O fato de ter encontrado *Campylobacter* spp. em miúdos de frango no presente estudo, em especial no fígado, expostos ao consumo humano em grandes redes de supermercado, é preocupante aos consumidores e manipuladores de alimentos, visto que essa pode ser uma fonte potencial de transmissão da campilobacteriose.

As três metodologias empregadas (*in natura*, enriquecimento e água de lavagem) foram eficazes na detecção de *Campylobacter* spp. nas duas coletas realizadas e não houve grande diferença entre elas quanto à eficiência no isolamento dessas bactérias.

Na primeira coleta, foram caracterizadas fenotipicamente nove cepas, sendo duas *Campylobacter jejuni* biotipo I, uma *Campylobacter jejuni* biotipo II, duas *Campylobacter coli* biotipo I, três *Campylobacter coli* biotipo II e uma cepa que, possivelmente, não se trata das espécies *C. jejuni* ou *C. coli*, pois não apresentou amplificação na PCR.

Tabela 1. Presença de *Campylobacter* nas amostras embaladas e manipuladas separadas por coleta.

Mercados	1ª coleta				2ª coleta				Total	
	Manipulado		Embalado		Manipulado		Embalado		positivo	total
	positivo	total	positivo	total	positivo	total	positivo	total		
A	0	1	3	3	1	2	1	2	5	8
B	2	3	1	1	0	1	0	3	3	8
C	3	4	0	0	2	4	0	0	5	8
D	0	0	4	4	0	0	2	4	6	8
E	2	2	2	2	0	2	1	2	5	8
TOTAL	7	10	10	10	3	9	4	11	24	40

A: localizado no município de Duque de Caxias/RJ; B, C, D e E: Localizados no município do Rio de Janeiro/RJ.



Os outros três isolados da primeira coleta foram identificados apenas ao nível de gênero (*Campylobacter* spp.), uma vez que adquiriram a forma cocóide, perdendo a sua viabilidade (Tabela 2).

Já na segunda coleta, foram caracterizadas duas cepas *Campylobacter jejuni* biotipo I, duas *Campylobacter jejuni* biotipo II, três *Campylobacter coli* biotipo I e um *Campylobacter coli* biotipo II (Tabela 2).

Os isolados identificados por provas bioquímicas foram submetidos a PCR para confirmação dos resultados positivos. Em relação à caracterização genotípica através da Multiplex-PCR, apenas as cepas da primeira coleta tiveram seu resultado fenotípico confirmado (Figura 2).

A pesquisa sobre a presença do gene da hipuricase também não foi satisfatória, pois apenas os controles apresentaram o resultado esperado (Tabela 2).

Sendo assim, a técnica de caracterização fenotípica utilizada para *Campylobacter* neste estudo permitiu a detecção de dezesseis cepas bacterianas provenientes de quarenta amostras, sendo 44% (n=7) *C. jejuni* e 56% (n=9) *C. coli* (tabela 2). Dessa forma, houve prevalência de *C. coli* para os pedaços e miúdos resfriados de frango analisados.

Do total de 16 cepas isoladas e caracterizadas, uma não se manteve cultivável para o antibiograma. Devido a isto, o teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado com 15 cepas de *Campylobacter* (Tabela 3).

A resistência às quinolonas foi observada frequentemente neste estudo, uma vez que 66,7% dos isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico e 66,7% foram resistentes a ciprofloxacina. Um fato interessante foi a acentuada resistência cruzada dentro deste

grupo, pois todas as cepas resistentes ao ácido nalidíxico eram concomitantemente resistentes a ciprofloxacina. Essa resistência cruzada de cepas de *Campylobacter* entre os antimicrobianos do grupo das quinolonas também foi observada por outro estudo<sup>20</sup> em amostras de frango resfriadas comercializadas e por diversos autores em diferentes países<sup>21,22,23</sup>.

O gênero *Campylobacter* é reconhecido por apresentar elevada resistência ao grupo das cefalosporinas, sendo este fato confirmado neste estudo pela alta resistência dos isolados à cefalotina, cefalosporina de 1ª geração, no entanto, observou-se um comportamento atípico frente à ceftriaxona, cefalosporina de 3ª geração, que apresentou 53,3% de cepas resistentes e 40% de cepas intermediárias a este antimicrobiano. Este fato pode ser explicado pelo surgimento da resistência a este antimicrobiano do ano de 2002 para o ano de 2003, seguindo para 2004, comprovando o comportamento incomum<sup>24</sup>.

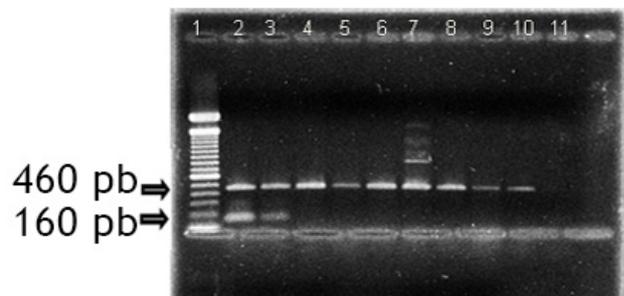


Figura 2. Eletroforese dos produtos de amplificação (Multiplex-PCR) das amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de cortes e miúdos de frangos. Amostras: 1 = Peso Molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen™); 2 = Controle Positivo (*Campylobacter jejuni* CCAMP 419); 3 = *C. jejuni* isolada neste estudo; 4 = Controle Positivo (*Campylobacter coli* CCAMP 1003); 5 - 10 = *C. coli* isoladas neste estudo; 11 = Controle Negativo (água).

Tabela 2. Caracterização de *Campylobacter* spp. isoladas das amostras de frango utilizando as técnicas fenotípicas e genotípicas.

Nº Amostra/Coleta	Hipurato	Dnase	Indoxil	Resultado	PCR Multiplex	PCR Hipuricase
B2/1	-	+	+	<i>C. coli</i> II	nc	-
B4/1	+	+	+	<i>C. jejuni</i> II	<i>C. jejuni</i>	nc
B14/1	+	-	+	<i>C. jejuni</i> I	<i>C. jejuni</i>	+
Sem7/1	Nc	+	+	<i>C. sp</i>	<i>C. coli</i>	-
Sem14/1	Nc	-	+	<i>C. sp</i>	<i>C. coli</i>	+
T3/1	-	-	+	<i>C. coli</i> I	<i>C. coli</i>	-
T14/1	+	-	+	<i>C. jejuni</i> I	<i>C. jejuni</i>	-
T17/1	Nc	+	+	<i>C. sp</i>	<i>C. coli</i>	-
T20/1	-	+	+	<i>C. coli</i> II	<i>C. coli</i>	-
B5/2	+	+	+	<i>C. jejuni</i> II	<i>C. coli</i>	-
B9/2	+	+	+	<i>C. jejuni</i> II	<i>C. coli</i>	-
B16/2	+	-	+	<i>C. jejuni</i> I	<i>C. coli</i>	-
Sem11/2	Nc	-	+	<i>C. sp</i>	<i>C. coli</i>	-
Sem16/2	-	-	+	<i>C. coli</i> I	<i>C. coli</i>	-
Sem19/2	+	-	+	<i>C. jejuni</i> I	<i>C. coli</i>	-
T14/2	-	+	+	<i>C. coli</i> II	<i>C. coli</i>	-
T18/2	Nc	-	+	<i>C. sp</i>	<i>C. coli</i>	-

B: metodologia de enriquecimento; Sem: metodologia "in natura"; T: metodologia "incubação da água de lavagem"; nc: resultados não conclusivos; C.sp.: *Campylobacter* sp.



Tabela 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *Campylobacter* isoladas e identificadas de cortes de frango.

Antimicrobianos	Número (%) de isolados resistentes
Ácido nalidíxico (NA)	10 (66,7%)
Ampicilina (AMP)	1 (6,7%)
Cefalotina (KF)	15 (100%)
Ceftriaxona (CRO)	8 (53,3%)
Ciprofloxacina (CIP)	10 (66,7%)
Cloranfenicol (C)	0 (0%)
Eritromicina (E)	1 (6,7%)
Gentamicina (CN)	0 (0%)
Cefoxitina (FOX)	15 (100%)
Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT)	15 (100%)
Tetraciclina (TE)	7 (46,7%)
Imipenen (IPM)	0 (0%)

De acordo com a identificação bioquímica das espécies termofílicas de *Campylobacter*, *C. jejuni* e *C. coli* são sensíveis ao ácido nalidíxico e resistentes a cefalotina, *C. lari* é resistente aos dois antibióticos e *C. upsaliensis* é sensível aos dois antibióticos. Neste estudo dez isolados apresentaram resistência aos dois antibióticos (característica de *C. lari*), entretanto alguns destes foram positivos no teste da hidrólise do hipurato sendo classificados como *C. jejuni*.

Em outro estudo, se identificou 167 isolados de *Campylobacter* e se encontrou seis isolados (3,6%) de *C. coli* e dois (1,2%) de *C. jejuni* resistentes ao ácido nalidíxico, porém, esses isolados foram confirmados pela PCR e caracterizados como cepas resistentes a este antibiótico<sup>14</sup>.

Dessa forma, com base nos resultados descritos acima e com a não confirmação dos testes fenotípicos pela PCR de algumas cepas, já mencionado anteriormente, mostra-se necessário rever a metodologia utilizada neste trabalho para a caracterização de *Campylobacter*, visto que é possível estar diante de espécies de *Campylobacter* descritas recentemente na literatura internacional, como *C. avium* sp. nov., *C. lanienae* sp. nov., dentre outras.

Todas as amostras foram sensíveis ao cloranfenicol e imipenen e obtiveram alta frequência de sensibilidade para gentamicina, com 66,7% (n = 7) de cepas sensíveis e 33,3% (n = 5) de cepas intermediárias. A sensibilidade à gentamicina é de grande importância para a saúde, por esta ser considerada uma droga alternativa no tratamento da campilobacteriose. Por outro lado, é importante ressaltar que, embora esse antimicrobiano não tenha apresentado cepas resistentes, foram encontradas cepas intermediárias, que podem estar indicando um processo de futura resistência a essa droga.

A ausência de resistência observada para cloranfenicol pode ser explicada por seu uso ter sido proibido na medicina veterinária com a publicação da Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento<sup>25</sup>.

Cabe ressaltar que o confronto desses resultados com outros descritos na literatura torna-se particularmente difícil, pois, como

citado anteriormente, não há uma padronização para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos para o gênero *Campylobacter*.

Também é importante enfatizar que a incidência de infecções humanas por *Campylobacter* vem aumentando progressivamente em muitas partes do mundo, assim como o número de cepas resistentes às quinolonas e, em menor número, aos macrolídeos.

A maior parte dos casos de enterites causadas por *Campylobacter* não requer tratamento com antimicrobianos, sendo a campilobacteriose uma doença breve, clinicamente leve e autolimitada. No entanto, algumas dessas infecções requerem tratamento medicamentoso, como nos casos graves e prolongados de enterite, sepse e outras infecções extra-intestinais. Atualmente, a eritromicina ou uma fluoroquinolona, como a ciprofloxacina, têm sido os antibióticos escolhidos<sup>26</sup>.

Dessa forma, como o alimento contaminado é um veículo habitual de infecção em humanos, a presença de cepas resistentes às quinolonas e aos macrolídeos na cadeia alimentar compromete o tratamento dessas infecções.

O surgimento de cepas de *Campylobacter* resistentes às quinolonas, isoladas de seres humanos na Holanda, coincidiu com a introdução de fluoroquinolonas na medicina veterinária. Atualmente, *Campylobacter* isolados de alimentos de origem animal resistentes a esse grupo de antimicrobianos têm sido reconhecidos como um problema de saúde emergente<sup>27</sup>.

Antimicrobianos promotores do crescimento (APC) são incorporados rotineiramente em rações de frangos visando melhorar a produtividade, entretanto sua prática não deve ser confundida com o uso terapêutico ou preventivo dos antimicrobianos. Estima-se que frangos criados até 40 dias com rações contendo esses APC a fim de incentivar o crescimento, podem apresentar até 50g a mais de peso do que frangos criados na ausência dessas substâncias.

A utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento em rações de aves foi abolida da Comunidade Europeia, entretanto a *Food and Drug Administration* (FDA/ EUA) concluiu não haver informação conclusiva de que o uso dessas drogas causa resistência em bactérias que infectam humanos, sendo assim o uso de APC reduziu significativamente mas não foi banido nos EUA<sup>20</sup>.

Infelizmente no Brasil a realidade não é diferente, embora as novas exigências do mercado europeu faça com que os países exportadores criem frangos nas mesmas condições da Europa<sup>20</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a presença de espécies de *Campylobacter* zoonóticas em pedaços e miúdos de frangos refrigerados, especialmente o fígado, vendidos para o consumo humano em grandes redes de supermercados sugerem a possibilidade da veiculação da campilobacteriose para a população através do consumo destes alimentos.

Conclui-se ainda que a ocorrência de *C. coli* foi predominante nas duas coletas e a variação das estações do ano, bem como



a diferença de temperatura, exerceu elevada influência sobre o índice de contaminação das amostras. As três metodologias utilizadas se mostraram eficazes na detecção de *Campylobacter* e não houve diferença entre elas, entretanto a metodologia genotípica deve ser aprimorada, com a inclusão de iniciadores oligonucleotídicos específicos que permitam a detecção de outras espécies de *Campylobacter* descritas recentemente, as quais podem estar presentes nas amostras analisadas.

Foi observada elevada resistência aos antibióticos da classe das quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), o que pode

prejudicar o tratamento dos casos mais graves de campilobacteriose e conseqüentemente resultar em um problema de saúde pública emergente.

Dessa forma, é importante ressaltar a necessidade de melhorar a qualidade higiênico-sanitária da produção de aves, evitando que o risco de contaminação chegue ao consumidor, além do contínuo incentivo às boas práticas de higiene e do adequado tratamento térmico da carne de frango por parte dos manipuladores de alimentos, dos comerciantes e dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization – WHO. Call for experts on Campylobacteriosis. Geneva: World Health Organization; 2012 [acesso em: 7 ago 2014]. Disponível em: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/PDF/Call.pdf>
2. Organização Mundial de Saúde – OMS. Cinco chaves para uma alimentação mais segura: manual. Geneva: Organização Mundial de Saúde; 2006 [acesso em: 7 ago 2014]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual\\_keys\\_portuguese.pdf](http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf)
3. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J. 2012;10(3):2597. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>
4. Moore JE, Caldweel PS, Millar BC, Murphy PG. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. Ulster Medical J. 2001;70(2):102-7.
5. Shane SM, Stern NJ. Campylobacter infection. In Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DA (ed.), Diseases of poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames; 2003. Cap.17, p.615-625.
6. Behrens JH, Barcellos MN, Frewer LJ, Nunes TP, Franco BDGM, Destro MT et al. Consumer purchase habits and views on food safety: a Brazilian study. Food Control. 2010;21(7):963-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.018>
7. Yan S, Pendrak M, Foley S, Powers JH. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. Clin Appl Immunol Rev. 2005;5:285-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cair.2005.08.001>
8. Fernandes M, Mena C, Silva J, Teixeira P. Study of cytolethal distending toxin (*cdt*) in *Campylobacter coli* using multiplex polymerase chain reaction assay and its distribution among clinical and food strains. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(1):103-6. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0326>
9. União Brasileira de Avicultura – UBABEF. Relatório anual = Annual report: 2010/2011. São Paulo: União Brasileira de Avicultura; 2011 [acesso em: 17 mar 2012]. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/abb3e2660dca967053335727b0cf74fd.pdf>
10. Filgueiras ALL, Hofer E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Rev Microbiol. 1989;20(3):303-8.
11. International Organization for Standardization – ISO. ISO 10272-1:2006: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
12. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett Appl Microbiol. 1989;8(4):151-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
13. Harmon KM, Ransom GM, Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1997;11(3):195-200. <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1997.0104>
14. Vilaro MCB, Thome JDS, Esteves WTC, Filgueiras ALL, Oliveira SS. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(5):499-501. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500003>
15. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol. 1997;35(10):2568-72.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement: approved document M100-S21. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. 12 jan 2001.
18. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, Zutter L. Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. Appl Environ Microbiol. 2008;74(17):5483-9. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00161-08>



19. Bouwknecht M, Giessen AW, Dam-Deisz WDC, Havelaar AH, Nagelkerke NJD, Henken AM. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med.* 2004;62(1):35-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.09.003>
20. Lopes GV. *Campylobacter* spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2009.
21. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int J Food Microbiol.* 2003;82(3):281-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00314-8)
22. Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E test., and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1062-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1062-1068.2003>
23. Taremi M, Dallal MMS, Gachkar L, Ardalan SM, Zolfagharian K, Kali MR. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(3):401-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.010>
24. Oliveira PSL. Rastreamento epidemiológico de amostras termofílicas de *Campylobacter*, utilizando métodos fenotípicos e genotípicos [monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Gama Filho; 2004.
25. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa n° 9, de 27 de junho de 2003. [Proíbe] a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da União. 9 jun 2003.
26. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanism and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):24-34.
27. Endtz HP, Ruijs GJ, Klingeren B, Janesen WH, Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother.* 1991;27(2):199-208. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/27.2.199>



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).