

ARTIGO

Bactérias Termofílicas do Gênero *Campylobacter* em Suínos do Estado do Rio de Janeiro.

Thermophilic bacteria of the genus *Campylobacter* Recovered from pigs in the State of Rio de Janeiro.

Luis Adan Flores Andrade

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil
E-mail: luisadanflores@gmail.com

Wagner Thadeu Cardoso Esteves

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Jacqueline Darc da Silva Thomé

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Ana Luzia Lauria-Filgueiras

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

O gênero *Campylobacter* pertencente à família Campylobacteriaceae está representado por bactérias que habitam o trato intestinal em várias espécies de animais e está associado a doenças de origem alimentar em vários países. Diversos fatores de virulência associados às espécies desse gênero podem levar à campilobacteriose, que, embora seja autolimitada em alguns casos, pode ser o gatilho para a Síndrome de Guillain-Barré (SGB). As principais espécies responsáveis por tornar a campilobacteriose uma zoonose pertencem ao grupo termofílico, representado pelas espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. O *C. coli* encontra-se presente na microbiota do sistema gastrointestinal de suínos, que possuem alta importância socioeconômica em relação ao consumo dessa carne; sendo assim, necessitam de estudos epidemiológicos em toda a cadeia de produção. O objetivo principal deste estudo foi investigar a presença de espécies termofílicas em suínos no estado do Rio de Janeiro; para isso foram coletadas 120 amostras, 100 oriundas de material fecal e 20 de carcaças. O *C. coli* foi isolado em 28 amostras de material fecal; entretanto, não foi obtido isolamento proveniente das carcaças. Embora o índice de colonização detectado neste estudo seja menor que em outros países, os suínos podem ser um veículo de transmissão da campilobacteriose para humanos, principalmente quando sua carne é proveniente de abatedouros não fiscalizados.

PALAVRAS-CHAVE: *Campylobacter* Termofílico; Suínos; Enterites, Saúde Pública

ABSTRACT

The genus *Campylobacter* belongs to the family Campylobacteriaceae which is represented by bacteria that inhabit the intestinal tract in various species of animals and is associated with foodborne disease in many countries. Several virulence factors associated to bacteria of this genus can lead to campylobacteriosis, which although it is self-limited in some cases may be the trigger for Guillain-Barré syndrome (GBS). The main species responsible for making campylobacteriosis a zoonosis of great importance to public health belong to the thermophilic group, represented by *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*. *C. coli* is considered as normal part of intestinal flora of pigs and because of the great socio-economic importance of the consumption of this meat in Brazil, epidemiological studies covering the entire production chain are necessary. The aim of this study was to investigate the presence of thermophilic species in pigs in the state of Rio de Janeiro where 120 samples were collected, of which 100 originated from fecal material and 20 from carcasses. *C. coli* was isolated in 28 samples of fecal material, however it was not isolated from carcasses. Despite the level of colonization detected in this study is lower than other countries, pork meat can be an important mean of campylobacteriosis transmission to humans, mainly from non inspected slaughterhouses.

KEYWORDS: Thermophilic *Campylobacter*; Pigs, Enteritis, Public Health



Introdução

O gênero *Campylobacter* pertence à família Campylobacteriaceae e está representado por bactérias Gram negativas com morfologia curva-espiralada, dentre as quais a maioria possui a capacidade de crescer em temperaturas que variam de 30°C a 42°C em uma atmosfera de microaerofilia. Contudo, algumas espécies desse gênero conseguem crescer em condições de aerobiose ou anerobiose¹.

Bactérias do gênero *Campylobacter* habitam o trato intestinal de várias espécies de animais e frequentemente estão associadas a doenças de origem alimentar em vários países, provocando diarreia e/ou disenteria no homem, que pode variar de uma forma mais suave até formas mais severas².

Isso se deve aos diversos fatores de virulência que foram identificados em bactérias desse gênero, entre os quais podem-se destacar: a presença de flagelos, que têm sua importância por permitirem ao *Campylobacter* spp. alcançar sítios de aderência ao intestino; proteínas CadF, que permitem essa aderência ao tecido; e toxinas codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, responsáveis por danificar os enterócitos, facilitando a penetração no epitélio intestinal³.

Embora a campilobacteriose geralmente seja autolimitada, as gastroenterites provocadas por *Campylobacter* spp. podem ser um gatilho para a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) em seres humanos. A SGB é uma desordem autoimune do sistema nervoso periférico, caracterizando-se por uma paresia ou paralisia que acomete geralmente de maneira assimétrica mais de um membro. A SGB é a causa mais frequente de paralisia flácida aguda após o advento da vacina contra a poliomielite e sua gravidade se deve ao fato de que em 20% dos casos pode evoluir à falência respiratória^{4,5}.

Estudos em pessoas apresentando quadro de campilobacteriose têm revelado que a maior parte dos casos se deve à presença de espécies do grupo termofílico ao qual pertencem as espécies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*. A infecção por esse grupo está associada ao consumo de carne vermelha e de aves, o que torna a campilobacteriose a doença gastrointestinal mais difundida no mundo, fazendo com que seja considerada uma zoonose de grande importância na saúde humana e veterinária⁶.

Entre as três espécies do grupo termofílico, o *C. coli* tem sido considerado como parte da microbiota normal do sistema gastrointestinal de suínos, devido à alta prevalência dessa espécie nos isolamentos, os quais podem chegar a até 99% em relação às outras espécies⁷.

O consumo de carne suína tem uma grande importância socioeconômica na população brasileira. Uma pesquisa realizada na cidade de Belo Horizonte - MG revelou que 28,4% consomem carne suína *in natura* uma vez por semana, 27,2% consomem de duas a três vezes por semana, 26,2% uma vez por mês, 11,2% quinzenalmente e 7% dos entrevistados consomem diariamente. Entretanto, 71,6% dos consumidores não procuram saber a origem do produto que estão adquirindo e somente 27,2% verificam essa informação⁸.

Devido à importância dos suínos na alimentação humana é necessária a realização de estudos epidemiológicos que cubram toda a cadeia de produção, da criação ao abate, pois agentes infecciosos clássicos, como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, ainda estão presentes e são motivo de preocupação tanto na exportação quanto no consumo interno desses animais⁹.

No Brasil a maioria dos trabalhos dessa magnitude já publicada está voltada para *Campylobacter jejuni* em carne de frango; no entanto, os estudos de *Campylobacter coli* em carne suína ainda são incipientes. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de espécies termofílicas do gênero *Campylobacter* na cadeia de produção suína no Rio de Janeiro.

Material e métodos

A detecção de bactérias termofílicas do gênero *Campylobacter* foi realizada em toda esfera da cadeia de produção de carne suína. O material fecal foi obtido a partir de duas fazendas de criação, denominadas Fazenda A e Fazenda B, localizadas nos municípios de Pirai e Bom Jardim, respectivamente, e uma criação domiciliar localizada no município de Magé, todos no estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas 20 amostras fecais de matrizes das fazendas A e B (n=40); 20 amostras fecais de suínos destinados ao abate (terminação) de cada uma das fazendas (n=40); 20 amostras de criação domiciliar (n=20) e 20 amostras de carcaças provenientes de um abatedouro inspecionado pelo Serviço de Inspeção estadual (SIE/RJ) (Figura 1).

Ottenção das amostras: O material foi obtido por meio da introdução de "Swab" no reto dos animais e inoculado em meio de cultura para transporte (Cary & Balir - Marca Difco), que foi mantido refrigerado em um isopor até a chegada ao laboratório. O material de carcaça foi obtido após a evisceração, pela raspagem com o "Swab" na parte interior da cavidade abdominal do suíno e inoculado em meio de cultura para transporte utilizando a mesma metodologia supracitada.

Processamento das amostras: O material inoculado em meio de transporte foi semeado em placa de Petri com meio seletivo contendo: Agar Columbia (Difco) com sangue de carneiro desfibrinado (10%), solução a 5% de FBP (sulfato ferroso-bissulfito de sódio e piruvato de sódio e uma solução de antibióticos contendo Cefalotina 11mg (Sigma-Aldrich, EUA), Lactato de trimetoprim 50mg (Roche, Suíça), Vancomicina 91mg (Sigma-Aldrich, EUA), Acti-dione 20mg (Upjohn, EUA) e Colistina 22mg (Sigma-Aldrich, EUA). As placas foram incubadas a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia. Ao término do período de incubação, as colônias foram analisadas morfológica e tintorialmente pela técnica de coloração de Gram.

Biotipificação das espécies¹⁰: foi analisada a presença da enzima desoxirribonuclease (DNase), que faz com que a bactéria tenha a capacidade de degradar DNA. Foi utilizado o meio de cultura para teste da DNase (Difco, EUA), contendo o revelador da digestão do DNA, representado pelo verde de metila.



Foi feito um inóculo de cultura pura de *Campylobacter* junto com um controle positivo, o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™). A placa foi incubada a 37°C por 48 horas, em atmosfera de microaerofilia. O resultado é considerado positivo quando ocorre a degradação de DNA, verificado pela presença de uma auréola mais clara ao redor do esfregaço, o que indica que o DNA em volta do crescimento foi degradado. O resultado é considerado negativo quando não há mudança na coloração do meio.

Identificação fenotípica: As colônias Gram negativas com morfologia característica de *Campylobacter* foram submetidas a provas com a finalidade de diferenciar as três espécies pertencentes ao grupo termofílico (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*).

A diferenciação dessas espécies foi realizada por meio da hidrólise de acetato de indoxina, positivo somente para *C. lari* e da hidrólise do hipurato, realizada apenas para *C. jejuni*¹¹⁻¹².

Identificação molecular: Para a realização da PCR foi realizada a extração do DNA genômico das cepas após a lise das células por método químico, utilizando-se o tiocianato de guanidina¹³. A diferenciação de *C. coli* e *C. jejuni* foi realizada pela Multiplex PCR, visando à identificação simultânea entre *C. coli* e *C. jejuni*, utilizando dois conjuntos de iniciadores: o conjunto I amplificando o gene *flaA* de *C. jejuni* e *C. coli*, gerando um produto de 460pb (Iniciador 1: 5'-GAACCTGAACCGATTG-3' e Iniciador 2: 5'-ATGGGATTCGTATTAAC-3'). O conjunto II amplifica um gene não determinado, único para *C. jejuni*, gerando um produto de 160pb (Iniciador 3: 5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3' e Iniciador 4: 5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3')¹⁴.

O volume final para a reação de amplificação foi 50 µL, sendo composto por 20 ng de DNA (valor estimado em GeneQuant pro RNA/DNA, Armesham Pharmacia Biotech) e pelos seguintes reagentes (Invitrogen Brasil Ltda): 10 mM de Tris-HCL; 50 mM de KCl; 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 5,5 mM de MgCl₂. 20 picomoles dos iniciadores 3 e 4; 40 picomoles dos iniciadores 1 e 2; e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase.

Controles positivos de *C. jejuni* subsp. *jejuni* (ATCC® 33291™) e de *C. coli* (CCAMP 1008, proveniente da coleção de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz) foram usados em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água bidestilada estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA alvo.

Os microtubos contendo os componentes da reação foram colocados no aparelho termociclador PTC 150 - MJ Research, Inc., utilizando o seguinte ciclo: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de amplificação, cada qual constituído de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 47°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. Ao término da reação, os produtos amplificados foram mantidos a -20°C, até a realização da eletroforese.

A separação dos produtos amplificados pela PCR foi feita através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5X e como padrão de peso molecular

o marcador de 100 pb (100 bp DNA Ladder Invitrogen Brasil Ltda.). Foram retirados 8 µL de cada tubo, que, juntamente com o corante bifásico de corrida, foram aplicados ao gel de agarose (Sigma-Aldrich, EUA) e submetidos a uma voltagem de aproximadamente 100 V/cm.

Os géis de agarose foram corados pela solução de brometo de etídio durante 15 minutos e visualizados sob luz UV, no transluminador (Chemical Company SIGMA T102). Na leitura do gel, a presença de somente uma banda com 460 pb indica *C. coli*, enquanto a presença de duas bandas de 160 e 460 pb caracteriza *C. jejuni*.

Resultados e discussão

Amostras de carcaças procedentes de abatedouro não se apresentaram contaminadas por *Campylobacter* spp. Este resultado pode estar associado às condições higiênico-sanitárias adotadas, além de outros fatores do processo operacional como, por exemplo, a utilização de mão de obra qualificada, tendo em vista que este se encontra regularmente inspecionado pelo SIE/RJ e tem cumprido as conformidades exigidas por esse órgão.

Nas amostras de fezes, o *C. coli* foi isolado em 28 amostras, sendo estas provenientes de 3 matrizes e 5 animais para abate na fazenda A, em 12 matrizes e 4 animais para abate na fazenda B e 4 animais para abate na criação domiciliar (Tabela 1). A identificação se deu de maneira genotípica pela PCR, e esses resultados foram corroborados pela identificação fenotípica, por meio da hidrólise do hipurato e hidrólise de acetato de indoxina.

A biotipificação das 28 amostras identificadas como *C. coli* revelou que 15 são do Tipo I (DNase negativas) e 13 do tipo II (DNase positivas), demonstrando uma relativa paridade. Na execução deste trabalho, não foi observado nenhum domínio ou maior distribuição de um Tipo sobre o outro (Tabela 2).

Esses dados sugerem que em animais para abate o número de isolados foi muito próximo, com uma média de isolamento de 22,5%; curiosamente esses dados não representam diferença significativa entre as fazendas de criação A e B, e o criadouro domiciliar, tendo em vista que este último não cumpre todas as conformidades para suinocultura propostas por Souto & Ralisch¹⁵.

Em relação às matrizes, houve uma diferença entre a fazenda A e fazenda B; esta última apresentou 45% a mais de animais infectados por *Campylobacter coli*. Pela semelhança entre as fazendas, quanto ao grau de infraestrutura, acreditamos que esse índice elevado de matrizes infectadas pode ser devido a algum surto ou fator estressante não detectado neste

Tabela 1: Positividade para *Campylobacter coli* em função da origem dos materiais.

	Fazenda A	Fazenda B	Criadouro Domiciliar
Matrizes positivas	3 (15%)	12 (60%)	—
Animais para abate positivos	5 (25%)	4 (20%)	4 (20%)
Total de amostras positivas	8 (20%)	16 (40%)	4 (20%)
Materiais analisados	40	40	20

Tabela 2: Identificação de *C. coli* oriundos de material fecal de suínos em três municípios do estado do Rio de Janeiro.

Amostra	Animal	Local	DNase	Hipurato de sódio	INDO-XILA	MULTIPLEX PCR (Organismo)	Bio-tipo
L11	Abate	Piraí	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L12	Abate	Piraí	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L14	Abate	Piraí	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L16	Abate	Piraí	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L18	Abate	Piraí	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L20	Matriz	Piraí	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L32	Matriz	Piraí	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L34	Matriz	Piraí	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L113	Abate	Magé	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L115	Abate	Magé	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L117	Abate	Magé	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L120	Abate	Magé	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L109	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L111	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L136	Matriz	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L137	Matriz	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L141	Matriz	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L143	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L144	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L146	Matriz	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L150	Matriz	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L155	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L157	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L159	Matriz	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L161	Abate	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L164	Abate	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II
L165	Abate	Bom Jardim	-	-	-	<i>C. coli</i>	I
L172	Abate	Bom Jardim	+	-	-	<i>C. coli</i>	II

trabalho. O estresse apresenta um efeito diferencial na função imunológica que, quando crônico, promove uma imunossupressão, que poderia ter originado essa diferença no número de animais contaminados por *C. coli*¹⁶.

Nossos dados indicam que os suínos apresentaram índice de colonização por *Campylobacter* menores quando comparados com os dados encontrados em outros países, que apresentam isolamentos de 55,8% para amostras de fezes, e variando entre 18,9% e 26% em amostras de carcaças, enquanto nossos dados indicam um percentual de isolamento de 28% para amostras fecais e 0% para amostras de carcaças¹⁷⁻¹⁸. Contudo, devido à natureza preliminar deste trabalho e ao pequeno número de amostras avaliadas, não é possível afirmar que o índice de animais infectados e carcaças contaminadas seja mais baixo que em outros países, sendo necessários estudos complementares que ampliem o número de amostras para poder observar um perfil estatisticamente mais acurado.

Conclusões

Embora o índice de colonização observado neste trabalho seja menor que em outros países, os suínos podem ser um veí-

culo de transmissão da campilobacteriose para humanos, ainda mais quando sua carne é proveniente de abatedouros não fiscalizados (em geral abastecidos por suínos de criações domiciliares) que particularmente são mais acessíveis economicamente; no entanto, sem garantia de qualidade daqueles inspecionados pelos órgãos competentes, colocando em risco a saúde do consumidor. Dessa forma, as camadas de menor poder aquisitivo da população podem estar mais expostas à campilobacteriose, seja por hábitos culturais, de alimentação, seja pela necessidade de optar por produtos mais acessíveis, e geralmente de pior qualidade em relação à contaminação microbiana.

Referências

1. Daskalov H, Maramski A. Prevalence and factors affecting the presence of *Campylobacter* spp. in broiler carcasses in Bulgaria. *Turk J Vet Anim Sci* 2012;36(5):539-45.
2. Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-Related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5(5):607-25.
3. Thakur S, Zhao S, McDermott PF, Harbottle H, Abbott J, English L, et al. Antimicrobial Resistance, Virulence, and



- Genotypic Profile Comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Humans and Retail Meats. *Foodborne Pathog Dis* 2010;7(7):835-44.
4. Cecatto SB, Garcia RID, Costa KS, Novais AB, Yoshimura R, Rapoport PB. Síndrome de Guillain-Barré como complicador de amigdalite aguda. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(4):566-9.
 5. Nyati KK, Prasad KN, Kharway NK, Soni P, Husain N, Agrawal V, et al. Immunopathology and Th1/Th2 immune response of *Campylobacter jejuni*-induced paralysis resembling Guillain-Barré Syndrome in chicken. *Med Microbiol Immunol* 2012;201(2):177-87.
 6. Dedieu L, Pagés MJ, Bolla MJ. The omp50 gene is transcriptionally controlled by a temperature-dependent mechanism conserved among thermophilic *Campylobacter* species. *Res Microbiol* 2008; 159(4):270-8.
 7. Varela NP, Friendship RM, Dewey CE. Prevalence of *Campylobacter* spp. Isolated from grower-finished pigs in Ontario. *Can Vet J* 2007;48(5):515-7.
 8. Faria IG, Ferreira JM, Garcia SK. Mercado consumidor de carne suína e derivados em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58(2):251-6.
 9. Moreira EC. Importância do controle da sanidade sobre produtos de origem animal. In: *II Simpósio de produção de Gado de corte*. 2002 [acessado 2013 Jul 22]. Viçosa (BR). Viçosa; 2002. Disponível em: http://www.simcorte.com/index/Palestras/s_simcorte/10_elvio.PDF
 10. Lior H. A new, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter lariidis*". *J Clin Microbiol* 1984;20(4):636-40.
 11. Popovic-Uroic T, Patton CM, Nicholson MA, Kiehlbauch. Evaluation of the Indoxyl Acetate Hydrolysis Test for Rapid Differentiation of *Campylobacter*, *helicobacter*, and *Wolinnella* Species. *J Clin Microbiol* 1990;28(10):2335-9.
 12. Morris GK, El Sherbeeney MR, Patton CM, Kodaka H, Lombard GL, Edmonds P, et al. Comparison of Four Hippurate Hydrolysis Methods for Identification of Thermophilic *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 1985;22(5):714-8.
 13. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8(4):151-6.
 14. Vilardo 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.
 15. Souto AR, Ralisch R. Índice de qualidade ambiental suínola (IQAS): Aspectos conceituais de métodos e aplicação. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 2007;11(4):441-8.
 16. Cunha MS, Lopez DR, Souza MBC. Variação na Contagem de leucócitos em *Callitrix jacchus* (Linnaeus, 1758) submetidos a uma situação de estresse agudo. (Juiz de Fora) *Rev Bras Zootec* 2005;7(2):219-29.
 17. Ghafir Y, China B, Dierick K, Zutter L, Daube G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *J Food Prot* 2008;71(1):35-45.
 18. Gebreyes WA, Thakur S, Morrow WE. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production system. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(4):765-8.

Data de recebimento: 18/02/2014

Data de aceite: 18/02/2014