

CAPÍTULO 1

***Campylobacter* em frangos de corte: detecção laboratorial, dinâmica de colonização e caracterização**

Clarissa Silveira Luiz Vaz

Daiane Voss Rech

Jenifer dos Santos Pozza

Gláucio Luís Mata Mattos

Arlei Coldebella

Virgínia Santiago Silva

Introdução

Campylobacter (C.) é o agente etiológico da campilobacteriose, uma das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes em diversos países, cujo principal fator de risco para a infecção humana é a ingestão de carne de frango contaminada e inadequadamente cozida. As espécies termófilas de *Campylobacter* colonizam o intestino das aves, nas quais não causam doença clínica ou perdas produtivas. Contudo, são relevantes para a avicultura de corte sob o ponto de vista da segurança dos alimentos, já que podem contaminar a carne durante o abate e processamento. O conhecimento de diversos aspectos epidemiológicos sobre *Campylobacter* na cadeia avícola é necessário para propor intervenções efetivas e economicamente viáveis para reduzir a colonização intestinal de frangos em idade pré-abate. Nesse sentido, pesquisas científicas ou monitorias voluntárias de lotes de frangos necessitam de suporte laboratorial para detecção microbiológica da bactéria, cujas características fastidiosas requerem meios de cultivo específicos e condições laboratoriais diferenciadas. Esse projeto viabilizou o início da pesquisa contemplando *Campylobacter* na avicultura pela Embrapa Suínos e Aves por meio da implantação de metodologias de detecção que permitiram analisar parâmetros específicos da bactéria em frangos de corte.

Objetivos

Apoiar a pesquisa voltada a *Campylobacter* na avicultura por meio da otimização de metodologias de diagnóstico laboratorial.

Determinar a dinâmica de colonização de frangos de corte ao longo do ciclo produtivo.

Analisar as características genotípicas de *C. jejuni* isolados no ambiente avícola.

Resultados e discussão

Detecção microbiológica e molecular

A detecção microbiológica foi padronizada para análise de fezes, suabes de cloaca e de arrasto, e cama de aviário. O material foi amostrado de 18 lotes de frangos de corte a partir de três semanas de idade, em integrações no Sul do Brasil. Foram comparadas duas estratégias para isolamento da bactéria: cultivo direto em diferentes ágar seletivos e enriquecimento em caldo seletivo por 24h ou 48h seguido de isolamento nos mesmos meios seletivos (VAZ et al., 2012c). Nas análises de fezes e cama de aviário, a frequência de isolamento de *Campylobacter* a partir do cultivo direto das amostras foi superior à obtida com o enriquecimento em caldo (Tabela 1). De fato, o cultivo direto em meio seletivo vem se apresentando mais adequado para a detecção de *Campylobacter* em amostras mais contaminadas, como fezes (UGARTE-RUIZ et al., 2012). Cabe ressaltar que o isolamento microbiológico também é difícil em amostras com discreta presença de *Campylobacter* devido a fatores como pH, estresse oxidativo, flora competidora e temperatura de incubação (WILLIAMS et al., 2012).

Considerando o cultivo direto, a identificação da bactéria foi maior em amostras de fezes semeadas em Ágar Preston (AP) (88,9%), suabes de cloaca semeados em Ágar Carvão-Cefoperazona-Deoxicolato modificado (mCCDA) (72,2%), suabes de arrasto semeados em Ágar Campy-Line (ACL) ou mCCDA (69,4%) e camas de aviário semeadas em AP (63,9%) (Tabela 1). AP foi o meio seletivo mais efetivo para isolamento de *Campylobacter* de cama de aviário ($P < 0,05$). Para as demais amostras não foi encontrada diferença significativa entre os meios avaliados no cultivo direto (VAZ et al., 2012c). Até o momento não existe um protocolo universalmente recomendado para isolamento microbiológico de *Campylobacter* em material avícola, por isso é fundamental utilizar estratégias previamente padronizadas que forneçam chances iguais de isolamento das diferentes linhagens e espécies de *Campylobacter* (UGARTE-RUIZ et al., 2012; WILLIAMS et al., 2012).

Tabela 1. Isolamento de *Campylobacter* em amostras de campo em função da matriz, caldo seletivo e meio de cultivo utilizado

Meio seletivo	Método de cultivo		
	Cultivo direto	Enriquecimento em caldo ^a (24h)	Enriquecimento em caldo (48h)
Cama de aviário			
AP ^b	63,89% ^e (23/36) aA ^f	30,56% (11/36) aB ^g	2,78% (1/36) C
ACL ^c	25,00% (9/36) bA	5,56% (2/36) bB	0,00% (0/36) B
mCCDA ^d	22,22% (8/36) bA	8,33% (3/36) bAB	0,00% (0/36) B
Suabe de cloaca			
AP	61,11% (22/36) A	69,44% (25/36) aA	11,11% (4/36) B
ACL	66,67% (24/36) A	25,00% (9/36) bB	5,56% (2/36) C
mCCDA	72,22% (26/36) A	38,89% (14/36) bB	22,22% (8/36) B
Fezes			
AP	88,89% (32/36) A	30,56% (11/36) aB	2,78% (1/36) C
ACL	77,78% (28/36) A	8,33% (3/36) bB	0,00% (0/36) B
mCCDA	83,33% (30/36) A	16,67% (6/36) abB	0,00% (0/36) C
Suabe de arrasto			
AP	61,11% (22/36) A	47,22% (17/36) aA	0,00% (0/36) B
ACL	69,44% (25/36) A	13,89% (5/36) bB	2,78% (1/36) B
mCCDA	69,44% (25/36) A	11,11% (4/36) bB	2,78% (1/36) B

^aEnriquecimento seletivo em Caldo Bolton

^bÁgar seletivo Preston

^cÁgar seletivo Campy-Line

^dÁgar seletivo Carvão-Cefoperazona-Deoxicolato modificado

^ePercentuais seguidos por letras minúsculas distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste

Exato de Fisher (P < 0,05)

^fPercentuais seguidos por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher (P < 0,05)

Todos os lotes de frangos de corte amostrados nesse estudo foram positivos para *Campylobacter* termófilos (Figura 1). Considerando os resultados obtidos pelo cultivo direto em AP, *C. jejuni* foi isolado em pool de fezes (86,1%), cama de aviário (63,9%), suabe de arrasto (61,1%) e suabe de cloaca (58,3%). Com esse mesmo protocolo, *C. coli* foi isolado de suabes de cloaca (2,8%) e pool de fezes (2,8%) (VAZ et al., 2012c). *C. jejuni* tem sido a espécie mais prevalente em frangos de corte, cujo reflexo para a segurança microbiológica da carne de frango precisa ser melhor entendido, visto que é também a espécie mais en-

volvida em campilobacteriose de origem alimentar (WAGENAAR, 2012; WILLIAMS et al., 2012).

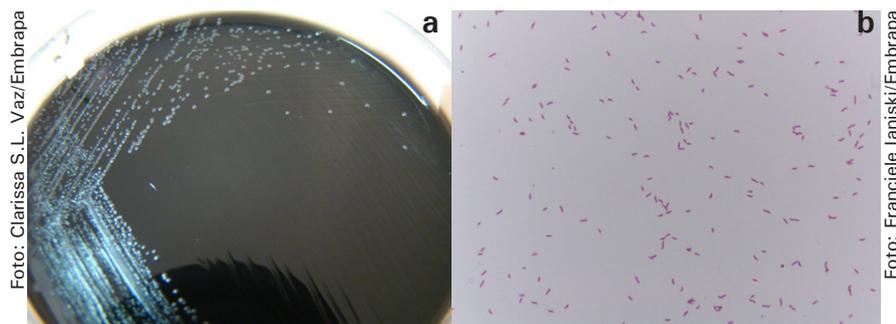


Foto: Clarissa S.L. Vaz/Embrapa

Foto: Franciele Janiski/Embrapa

Figura 1. Colônias de *Campylobacter jejuni* em meio seletivo (mCCDA) (a) e morfologia ao microscópio óptico (aumento de 1000 X) após coloração de Gram (b)

Por outro lado, todas as espécies termófilas de *Campylobacter* são consideradas de potencial risco à saúde pública (WAGENAAR, 2012). Como alternativa ao isolamento microbiológico convencional, nesse projeto também se padronizou um ensaio de PCR para detecção de espécies termófilas de *Campylobacter* a partir de suabes de cloaca, conteúdo cecal e carcaças de frango. O ensaio detecta o produto de 287 pares de bases (pb) (Figura 2) utilizando um par de iniciadores que flanqueia uma região do gene RNAr 16S de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* (ALVES et al., 2012). Por meio de PCR é possível detectar as formas viáveis mas não cultiváveis de *Campylobacter* (UGARTE-RUIZ et al., 2012), reforçando sua importância como ferramenta complementar para a análise dessa bactéria em alimentos.

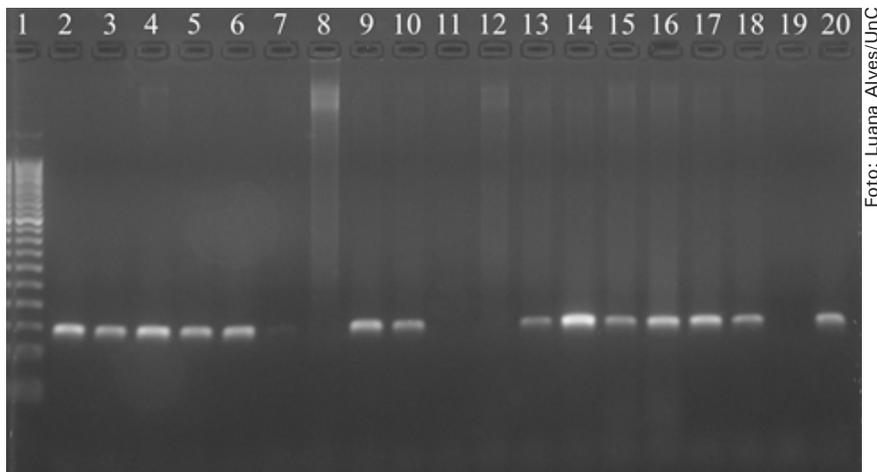


Figura 2. Amplificação por PCR de um produto de 287 pb em *Campylobacter* termófilos. 1: marcador de tamanho molecular (*ladder* 100 pb); 2-7, 9-10, 13-18: reações positivas; 8,11,12: reações negativas; 19: controle negativo; 20: controle positivo

Dinâmica de colonização de frangos de corte

A disponibilidade do suporte laboratorial para a pesquisa com *Campylobacter* possibilitou analisar a dinâmica da colonização intestinal de frangos nesse projeto. Foram avaliados três lotes consecutivos de frangos de corte alojados em aviário experimental até os 42 dias de idade, sobre cama reutilizada de três lotes anteriores. O vazio entre lotes foi de 14 dias, período em que também foi realizado o tratamento da cama por enleiramento. Os pintos foram considerados negativos para *Campylobacter* mediante análise bacteriológica de suabes das caixas de transporte, coletados na chegada ao aviário. A análise bacteriológica da cama reutilizada, após o tratamento fermentativo, foi negativa para *Campylobacter*. Semanalmente foram colhidos *pool* de suabes de cloaca dos frangos, *pool* da cama e cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*) para monitoria microbiológica de *Campylobacter* (VAZ et al., 2012b).

A análise microbiológica dos suabes de cloaca mostrou que a colonização dos frangos do lote 2 por *Campylobacter* ocorreu mais cedo em relação aos lotes 1 e 3 (Figura 3). Por meio de regressão logística, foi estimado que 50% dos suabes de cloaca coletados dos frangos do lote 2 foram positivos aos 17,9 dias de idade comparado aos 28,4 dias dos lotes 1 e 3. Aos 42 dias de idade, os lotes amostrados apresentaram entre 97,3% e 100% das aves colonizadas por *Campylobacter* (VAZ et al., 2012b). De modo semelhante, um estudo longitudinal realizado em perus de corte mostrou que a partir do primeiro isolamento de *Campylobacter* no lote, rapidamente a maioria das amostras passa a ser positiva, e a colonização das aves persiste em altos níveis até a idade pré-abate (GIACOMELLI et al., 2012). Esses dados reforçam que a idade do lote é o fator mais determinante para a prevalência de *Campylobacter* (COLLES et al., 2011).

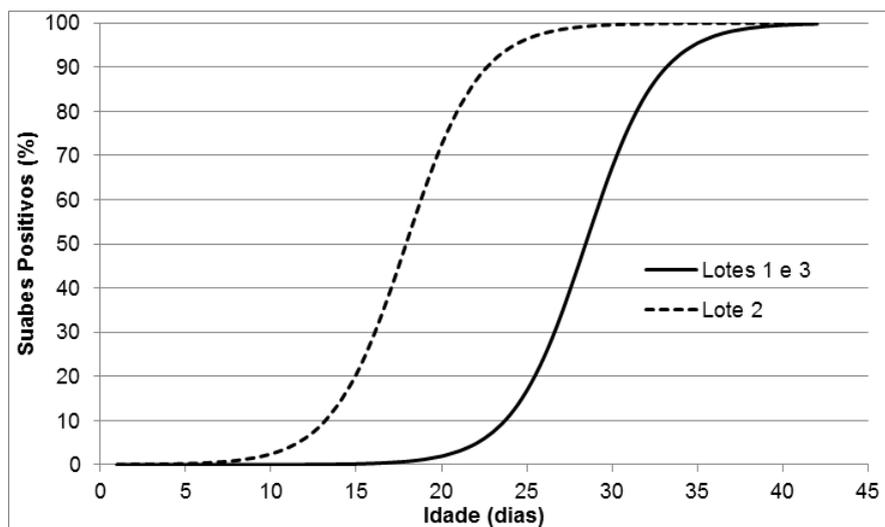


Figura 3. Percentual de suabes de cloaca positivos para *Campylobacter* segundo modelo logístico ajustado

Campylobacter foi também detectado na cama de aviário aos 21 dias (lotes 2 e 3) e 35 dias (lote 1), que permaneceu contaminada até o final do período de alojamento. A bactéria foi isolada de cascudinhos amostrados a partir dos 28 e 35 dias nos lotes 2 e 3, respectivamente (VAZ et al., 2012b). A presença de cascudinhos positivos para *Campylobacter* foi um indicador da contaminação no aviário, naquele momento, e reforça sua importância como potencial reservatório da bactéria no ambiente avícola. Esse estudo inicial mostrou a importância do vazio entre lotes e o tratamento de cama na redução ou eliminação da contaminação residual do aviário por *Campylobacter*. O ambiente intestinal das aves parece favorável à multiplicação de *Campylobacter*, contribuindo para a disseminação da contaminação no aviário a partir do início da colonização dos frangos.

Diversidade genética de *Campylobacter*

Como ferramenta de apoio ao diagnóstico de *Campylobacter*, nesse projeto também foi implantado o ensaio de macrorestrição de DNA para genotipificação de isolados de campo. Foram analisadas 132 cepas de *C. jejuni* isoladas de três empresas (A, B e C), sendo identificados genótipos característicos em cada uma, os quais foram agrupados separadamente segundo a análise de *cluster* (Figura 4). Foi possível perceber que algumas linhagens de *Campylobacter* circulam em diferentes granjas comerciais, distantes entre si, mas pertencentes à mesma integração (empresa B), por isso fatores individuais podem estar relacionados com a manutenção dessas cepas nos lotes e aviários, como por exemplo, a existência de uma fonte comum de contaminação (VAZ et al., 2012a).

A genotipificação de *C. jejuni* indicou que as aves podem ser colonizadas por diferentes subtipos da bactéria, assim como podem ocorrer diferenças na distribuição e dinâmica epidemiológica dessas linhagens entre lotes (GIACOMELLI et al., 2012). Esse resultado sugere a necessidade de estudos voltados ao entendimento do ambiente como fonte de *Campylobacter* para os lotes de frangos de corte.

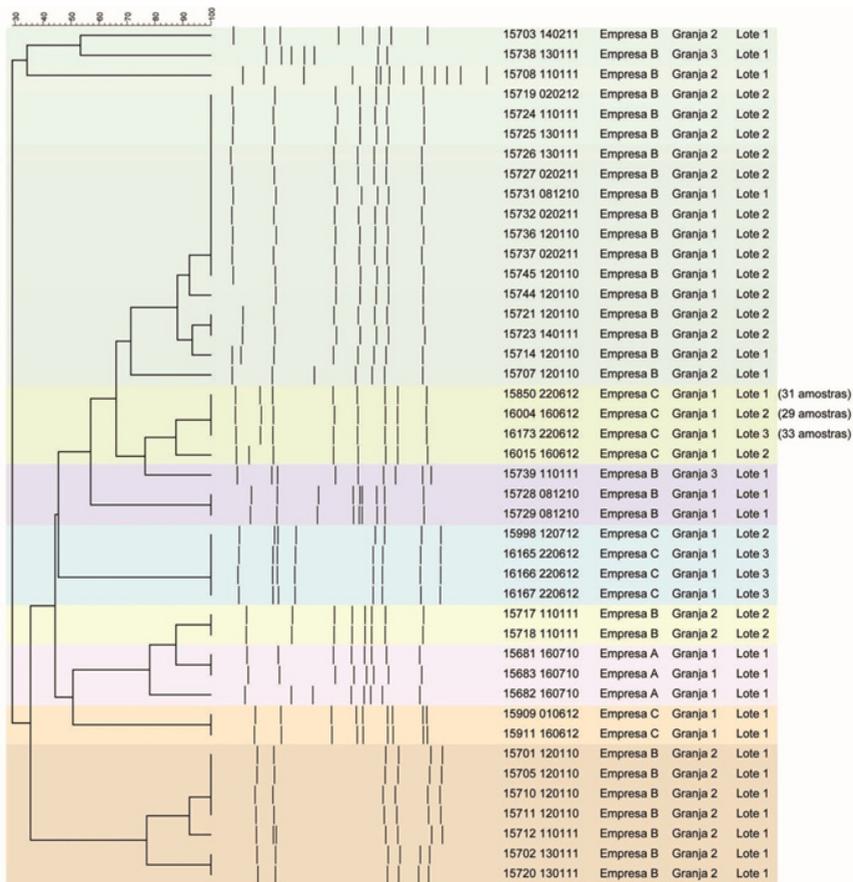


Figura 4. Relação entre os genótipos de *Campylobacter jejuni* procedentes de granjas de frangos de corte. A similaridade foi calculada pelo coeficiente de Dice e o dendrograma gerado por UPGMA. Cores diferentes separam os grupos de cepas isoladas em cada empresa amostrada (A, B e C)

Tecnologias geradas

- Frequência de *Campylobacter* em granjas de frangos de corte no sul do Brasil (Monitoramento/zonamento, 2012);
- Metodologia de PCR para detecção de *Campylobacter* termófilos em material avícola (Metodologia científica, 2012);
- Metodologia para detecção microbiológica de *Campylobacter* termófilos em frangos de corte (Metodologia científica, 2012);
- Monitoramento das características fenotípicas e genotípicas de *Campylobacter* termófilos isolados de amostras de frangos de corte no Brasil (Monitoramento/zonamento, 2011).

Principais publicações

ALVES, L.; RECH, D. V.; SILVA, V. S.; POZZA, J. dos S.; VAZ, C. S. L. Study of thermophilic *Campylobacter* contamination of a broiler batch at slaughter. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 3, p. 1-7, 2012.

GRITTI, D.; VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; ALVES, L.; BORTOLINI, F. Thermophilic *campylobacter* survey in chilled and frozen poultry meat at retail in Concórdia, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 3, pub. 976, 2011.

VAZ, C. S. L. (Ed.). **Anais do Workshop de Diagnóstico microbiológico de *campylobacter* aplicado à avicultura**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. 42 p. (Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 155).

VAZ, C. S. L.; MATTHIENSEN, A.; VOSS-RECH, D.; ALBINO, J. J.; SOUZA, J. C. V. B. ***Campylobacter*: o que é? como evitá-lo?** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. 2 p. 1 folder.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. *Campylobacter* como contaminante da cama de aviário. **Avicultura Industrial**, Itu, ed. 1216, ano 103, n. 10, p. 12-17, 2012.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; SANTOS, F. B. de O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. In: WORLD 'S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. **Abstract...** Salvador: WSPA, 2012. 1 CD-ROM. Poultry Science Journal, v. 68, supl. 1, 2012.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; SANTOS, F. B. de O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in commercial broiler farms in southern Brazil using different culturing techniques and selective media. In: WORLD 'S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. **Abstract...** Salvador: WSPA, 2012. 1 CD-ROM. World's Poultry Science Journal, v. 68, supl. 1, 2012.

Considerações finais

O presente projeto de pesquisa mostrou que o sucesso no isolamento bacteriológico de *Campylobacter* varia de acordo com o protocolo utilizado, reforçando a importância de utilizar métodos padronizados na análise de material avícola. Por meio dos protocolos de detecção ora implantados, foi identificada elevada frequência de *C. jejuni* em lotes de frangos de corte na idade pré-abate. Por outro lado, os pintos de corte encontravam-se livres de *Campylobacter* no momento do alojamento no aviário, porém a bactéria passou a ser detectada entre a terceira ou quarta semana de vida, mesmo sob condições estritas de biosseguridade, disseminando-se gradativamente até o período pré-abate. Entretanto, o vazio entre lotes e o tratamento da cama mostraram-se efetivos para diminuir ou eliminar a contaminação residual no aviário. Finalmente, a análise genotípica de *Campylobacter* revelou a circulação de linhagens características em cada integração, mas que se repetiram

em diferentes lotes e granjas da mesma empresa, sugerindo o envolvimento de fatores individuais na circulação e manutenção da bactéria.

Os autores agradecem ao colega Altair Althaus pelo valioso auxílio na colheita de material de campo e às empresas que foram parceiras nesse projeto por meio da autorização de acesso às granjas e disponibilização de médicos veterinários para acompanhamento das colheitas. Essa pesquisa recebeu aporte financeiro do CNPq (edital 064/2008, processo nº 578086/2008-5).

Referências

ALVES, L.; RECH, D. V.; SILVA, V. S.; POZZA, J. dos S.; VAZ, C. S. L. Study of thermophilic *campylobacter* contamination of a broiler batch at slaughter. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 3, p. 1-7, 2012.

COLLES, F. M.; McCARTHY, N. D.; LAYTON, R.; MAIDEN, M. C. J. The prevalence of *campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e.22825. 2011.

GIACOMELLI, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; MARTINI, M.; PICCIRILLO, A. A longitudinal study on thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks in Northern Italy: occurrence and genetic diversity. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 56, p. 693-700. 2012.

UGARTE-RUIZ, M.; GÓMEZ-BARRERO, S.; PORRERO, M. C.; ÁLVAREZ, J.; GARCÍA, M.; COMERÓN, M. C.; WASSENAAR, T. M.; DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p. 200-208. 2012.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. *Campylobacter* como contaminante da cama de aviário. **Avicultura Industrial**, Itu, ed. 1216, ano 103, n. 10, p. 12-17, 2012a.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; SANTOS, F. B. de O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. In: WORLD ´S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. **Abstract...** Salvador: WSPA, 2012. 1 CD-ROM. Poultry Science Journal, v. 68, supl. 1, 2012b.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; POZZA, J. dos S.; SANTOS, F. B. de O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in commercial broiler farms in southern Brazil using different culturing techniques and selective media. In: WORLD ´S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. **Abstract...** Salvador: WSPA, 2012. 1 CD-ROM. Poultry Science Journal, v. 68, supl. 1, 2012b.

WAGENAAR, J. *Campylobacter*: a friend of poultry but an enemy of public health. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 68, n.1, p. 1-8. 2012.

WILLIAMS, L. K.; SAIT, L. C.; COGAN, T. A.; JØRGENSEN, F.; GROGON-THOMAS, R.; HUMPHREY, T. J. Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 140, p. 1227-1235. 2012.