

Comparação entre ensaio imunoenzimático VIDAS[®] *Campylobacter* e reação em cadeia pela polimerase em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas provenientes de abatedouros goianos

Thatyana Lacerda de Almeida¹, Cíntia Silva Minafra e Rezende², Edmar Soares Nicolau³,
Marília Cristina Sola⁴, Sandra Queiroz Porto de Mesquita⁵

¹Orientando - thatyanalacerda@hotmail.com, 2. Orientador, Doutor, Docente EVZ/UFG - cintia@cpa.vet.ufg.br, 3. Doutor, Docente EVZ/UFG, 4. Estudante de Doutorado Ciência Animal, 5. Bióloga, servidor EVZ/UFG.

PALAVRAS-CHAVE: biologia molecular, *Campylobacter* spp., carne de frango, ensaio imunoenzimático.

1 Introdução

A produção de alimentos de origem avícola em escala industrial, no Brasil, é expressiva e organizada. Apontamentos feitos à segurança microbiológica destes alimentos determinam a necessidade de uma série de programas de controle para as aves nas diferentes fases da vida e processamento.

Em 2006, o gênero *Campylobacter* foi classificado como patógeno de maior associação a surtos na União Européia, mesmo que a maioria dos casos relatados tenha sido considerada esporádica (BRONZWAER et al., 2009). Outro dado indesejável residiu na informação de que frangos são denominados como principais carreadores destes patógenos em abatedouros (FAO/WHO, 2009). Diversas são as fontes de campilobacteriose, porém cerca de 70% dos casos, a infecção tem origem a partir da carne de frango crua ou mal cozida, uma vez que carcaças de frango são apontadas como excelentes reservatórios de *Campylobacter jejuni*, a espécie de maior frequência de isolamento (NAUTA et al., 2009).

Um fator crítico para o diagnóstico laboratorial de alimentos de origem animal refere-se aos ensaios analíticos empregados para a identificação ou detecção deste patógeno.

¹ Orientando - thatyanalacerda@hotmail.com, 2. Orientador, Doutor, Docente EVZ/UFG - cintia@cpa.vet.ufg.br, 3. Doutor, Docente EVZ/UFG, 4. Estudante de Doutorado Ciência Animal, 5. Bióloga, servidor EVZ/UFG.

Revisado pelo Orientador -

O isolamento convencional bacteriano demanda entre oito a dez dias para que haja cultivo e identificação do microrganismo (ISO 10272-1:2006E), é um ensaio validado. Por outro lado, existem descrições metodológicas cujo princípio da biologia molecular confere alto grau de confiabilidade, especificidade e rapidez. Um exemplo apropriado é a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real (BOTTELDOORN et al., 2008). Apesar da rapidez, esta análise não é reconhecida pelos órgãos oficiais de fiscalização.

Ainda, como recursos diagnósticos, há o ensaio imunoenzimático, baseado na reação antigênica, conhecido como VIDAS[®] *Campylobacter*. Este método analítico é validado para análise em alimentos, confere especificidade, confiabilidade e agilidade, pois em 50 horas é possível confirmar a presença ou não da bactéria (bioMérieux, VIDAS[®] *Campylobacter*, REF 30111-07999 H - pt - 2007/09). Pelo exposto, objetivou-se com este estudo verificar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos e moelas, comparando as técnicas de PCR em tempo real e VIDAS[®] *Campylobacter*.

2 Metodologia

Foram analisadas 120 amostras oriundas de quatro abatedouros (A, B, C e D) do estado de Goiás, compostas por 60 carcaças de frango e 60 vísceras comestíveis - moela. As amostras foram colhidas dentro dos abatedouros, armazenadas em sacos plásticos apropriados, individualmente, identificadas e transportadas sob refrigeração imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás, para que as análises fossem efetuadas. Cada amostra representou uma ave encaminhada ao abate. Primou-se pela utilização de dois métodos analíticos (ensaio imunoenzimático, VIDAS[®] Campy) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, para todas as amostras.

Inicialmente, adotou-se a metodologia segundo a ISO 10272-1 (2006), que exige a execução da fase de enriquecimento em caldo seletivo Bolton, suplementado com antibióticos. Em nove mL de caldo Bolton, foi adicionado um grama de amostra previamente triturada e homogeneizada. O inóculo foi incubado em atmosfera microaerófila a 37 ± 1 °C/ 4-6 horas e depois incubado a $41,5 \pm 1$ °C/ 44 ± 4 horas.

Os tubos foram aquecidos por 15 minutos a aproximadamente 100°C. Após este processo, os tubos foram dispostos em bancada para diminuição de temperatura na forma gradual. Em seguida, dois mL do caldo de cultura foram transferidos para o barrete do kit VIDAS[®] *Campylobacter* e procedeu-se a avaliação da amostra em equipamento MINIVIDAS[®]. Os resultados foram expressos em positivo e negativo. Vale salientar que após o período de

incubação, de cada tubo recolheu-se 1,5 mL transferido para tubos de polipropileno, com o objetivo de estocar material proveniente de uma mesma amostra para o ensaio de PCR em tempo real.

Para a análise de PCR em tempo real, seguiu parcialmente as determinações de BOTTELDOORN et al. (2008). Além dos iniciadores, da tecnologia PCR convencional, utilizou-se um terceiro oligonucleotídeo (sonda TaqMan). Essa sonda tem sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher*, essa molécula determina a ocorrência de um fenômeno denominado FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, que absorve a fluorescência emitida por esse fluoróforo, transferindo o sinal que será convertido em curvas específicas. O *primer* selecionado referiu-se ao gene 16S rRNA, sequências campF2 (5'-CACGTGCTACAATGGCATAT-3') e campR2 (5'-GGCTTCATGCTCTCGAGTT-3').

À medida que a reação ocorreu e os ciclos aumentaram, observou-se que a fluorescência foi intensificada. Quando essa fluorescência emitida pelo fluoróforo atingiu limiar acima da fluorescência basal da reação, o *software* do sistema utilizado correlacionou o ciclo em que isso ocorreu (Ct), apresentando o resultado de positividade das amostras.

Para a análise de PCR em tempo real do presente estudo, as culturas em caldo Bolton foram comprimidas no cartão FTA, Whatmann®, com auxílio de suabes esterilizados. Estes cartões são compostos por uma matriz quimicamente tratada destinada à coleta, transporte, armazenagem e extração de ácidos nucleicos.

Após o contato dos suabes com os cartões nas regiões marcadas, o material foi disposto em fluxo laminar para secagem. Após a secagem seguiu-se para a eluição do DNA das amostras. A eluição do DNA foi realizada segundo o protocolo do fabricante. Ao DNA extraído foi adicionado o *mix* PCR contendo os *primers* e sondas desenhados e sintetizados de acordo com a região conservada do genoma para o gênero *Campylobacter*. Após a adição dos reagentes a leitura da fluorescência foi feita pelo equipamento Step One Plus, que durou em torno de 100 minutos. A reação de PCR em tempo real ocorreu em um intervalo de 99,5% de confiança e foram adotados tanto os controles positivos quanto os controles negativos que em testes anteriores apresentaram resultados satisfatórios.

Em fase anterior à execução analítica de amostras dos abatedouros, procedeu-se análise de culturas puras de *Campylobacter* spp. e de cepa referência do Instituto Adolfo Lutz de *Campylobacter jejuni*. Houve a incubação em caldo Bolton, suplementado com antibióticos, em atmosfera microaerófila a 37±1 °C/ 4-6 horas e posterior incubação a 41,5±1

°C/ 44±4 horas. Foram utilizados dez cultivos ao todo. Amostras de caldos foram transferidas para cartões FTA e avaliadas pelo PCR em tempo real.

3 Resultados

As cepas classificadas como puras e de referência foram 100% de detecção e identificação para PCR em tempo real e VIDAS® Campy. Em outro parâmetro, a avaliação laboratorial de material proveniente de culturas mistas ou dos lotes de frangos abatidos no estado de Goiás revelou que a bactéria *Campylobacter* spp. esteve presente na maioria. Quando o lote foi avaliado pelo ensaio imunoenzimático (VIDAS® Campy), verificou-se 33,33% de amostras positivas (Tabela 1). Também, foi possível verificar que o método de PCR em tempo real foi mais representativo por ter apresentado 41,67% de positividade para as mesmas amostras avaliadas.

Tabela 1 – *Campylobacter* spp. em lotes de frangos abatidos de agroindústrias de Goiás

Agroindústria	Lotes positivos/lotes analisados		% de lotes positivos	
	VIDAS® Campy	PCR em tempo real	VIDAS® Campy	PCR em tempo real
A	0/3	1/3	-	33,33
B	1/3	1/3	33,33	33,33
C	2/3	2/3	66,67	66,77
D	1/3	1/3	33,33	33,33
TOTAL	4/12	5/12	33,33	41,67

A frequência de ocorrência do patógeno em carne (carcaças destinados ao consumo e moelas) pode ser visualizada na Tabela 2. Conforme os resultados, 10,83% das amostras analisadas pelo método VIDAS® Campy mostraram-se positivas. Considerando o outro método, observou-se que em 12,50% das amostras detectou-se *Campylobacter* spp.

Tabela 2 – Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas, de quatro lotes abatidos

Agroindústria	Amostras de carne de aves		% de positivas	
	VIDAS® Campy	PCR em tempo real	VIDAS® Campy	PCR em tempo real
A	0/30	1/30	-	3,33
B	3/30	3/30	10	10
C	5/30	5/30	16,67	16,67
D	5/30	6/30	16,67	20
TOTAL	13/120	15/120	10,83	12,50

Analisando a Tabela 3, pode-se verificar que houve diferença entre a identificação/detecção do agente conforme a matriz alimentar.

Tabela 3 – Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne de frangos de agroindústrias do estado de Goiás

Matriz alimentar	positivas/ analisadas		Frequência relativa VIDAS® Campy (%)	Frequência relativa PCR tr ^{**} (%)
	VIDAS® Campy [*]	PCR tr ^{**}		
Carcaça de frango	5/60	6/60	8,33	10
Moela	8/60	9/60	13,33	15
TOTAL	13/120	15/120	10,83	12,50

* VIDAS® Campy – ensaio imunoenzimático

** PCR tr – reação em cadeia pela polimerase, tempo real

4 Discussão

Um parâmetro relevante reside na informação de que se observou diferença entre as metodologias empregadas, quando as culturas eram oriundas de culturas mistas, ou seja, de carcaças e moelas. Tal contraste não foi verificado quando se avaliou culturas puras.

Os resultados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 permitem discorrer que os lotes de frangos encaminhados ao abate, em agroindústrias localizadas no estado de Goiás, têm apresentado o agente patogênico. Considerando as características da bactéria, quanto à sua disseminação entre aves e baixa resistência ao ambiente, pode-se inferir que há alto risco em sua perpetuação no ambiente de abate e difusão entre alimentos que serão destinados à população. Dos doze lotes avaliados, cinco e seis foram positivos, por VIDAS® Campy e PCR em tempo real, respectivamente; revelando que produtos de origem avícola podem veicular *Campylobacter* spp.

A diferença observada entre os percentuais dos ensaios pode ser explicada pelo estresse celular que colônias de *Campylobacter* sofrem frente à competição com outros microrganismos possivelmente presentes nas amostras avaliadas, mesmo havendo a incubação preconizada como etapa determinante ao êxito analítico. Ressalta-se que pode haver morte de bactérias, não sendo possível identificar o agente pelo ensaio VIDAS® Campylobacter, e conseqüente ausência de reação. Deste modo, é de se esperar que o PCR em tempo real seja superior ao outro método, pelo fato de detectar sequência genômica de *Campylobacter* spp., por detectar inclusive agentes sem viabilidade celular. De acordo com BOTTELDOORN et

al. (2008), PCR em tempo real é excelente ferramenta analítica, apresentando melhores resultados inclusive sobre o isolamento bacteriano convencional.

Os estudos de CARVALHO et al. (2002) sobre contaminação de carcaças de frango em abatedouros localizados no Brasil, concluíram que diversas etapas do processamento, incluindo a evisceração, representam risco à disseminação do agente em questão. HUMPHREY et al. (2007) descreveram que a bactéria é mais significativa nas aves, sendo um dos motivos pelos quais a carne de frango vem sendo responsabilizada como a principal fonte de *Campylobacter* para os consumidores.

Por estas declarações, reafirma-se que os achados do presente estudo salientam maior atenção à possibilidade de contaminação do alimento e às etapas de abate, por haver possibilidade de contaminação entre carcaças.

Em concordância a este estudo, pesquisas anteriores de REZENDE et al (2011) demonstraram que 11,11% de moelas analisadas no estado de Goiás, mostraram-se positivas, sendo porém avaliadas por um ensaio não considerado no presente estudo. Os percentuais identificados aqui se referiram a 13,33% e 15%, respectivamente pelo ensaio VIDAS[®] *Campylobacter* e PCR em tempo real, consideradas superiores ao isolamento bacteriano convencional. Por outro lado, observou-se que em média 8,33% e 10% de carcaças mostraram-se positivas aos ensaios VIDAS[®] *Campylobacter* e PCR em tempo real, respectivamente. Os mesmos autores supramencionados isolaram o patógeno em 66,70% das carcaças pesquisadas.

Todos estes resultados denotam a necessidade de fiscalização severa de toda a cadeia produtiva de alimentos avícolas quanto à presença do agente e também de criação de legislação que obrigue o monitoramento de carcaças refrigeradas e vísceras comestíveis. Acredita-se que com o enorme vulto da comercialização de carne de frango nas esferas nacional e internacional, em breve o Brasil será obrigado a ter sistemas de vigilância sobre estas matrizes alimentares e este microrganismo patogênico.

Deste modo os dados obtidos neste estudo salientam o risco associado à presença de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas.

5 Conclusão

Considerando os resultados do presente estudo, é importante salientar que:

- *Campylobacter* foi identificada em alimentos de origem avícola liberados para consumo;

- A técnica de PCR em tempo real demonstrou maior percentual de detecção do agente.
- A presença de *Campylobacter* spp. em 10,83% das amostras, provenientes do ensaio VIDAS® *Campylobacter* denotou a viabilidade do agente em amostras aviárias.

Referências

BIOMÉRIEUX. VIDAS® *Campylobacter*. REF 30111-07999 H - pt - 2007/09, 6 páginas.

BOTTELDOORN, N.; VAN COILLIE, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRICKX, M.; HERMAM, L.; MESSENS, W. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, n. 105, p. 1909-1918, 2008.

BRONZWAER, S.; HUGASA, M.; COLLINS, J.D.; NEWELL, D.G.; ROBINSON, T.; MAKELA, A. P.; HAVELAAR, A. Scientific Colloquium-assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131 (2-3), p. 284-285, 2009 [RESUMO].

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 89-94, 2002.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION *Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting Report. 2009*. Microbiological risk assessment series, 69 p., 2009.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S. MADSEN, M. *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective*. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 117, n.3, p. 237-257, 2007.

ISO 10272-1:2006(E). INTERNATIONAL STANDARD. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method.** 16 páginas.

NAUTA, M.; HILL, A.; ROSENQUIST, H.; BRYNESTAD, S.; FETSCH, A.; van der LOGT, P.; FAZIL, A.; CHRISTENSEN, B.; KATSMA, E.; BORCK, B; HAVELAAR, A. Comparision os risks assessments on Campylobacter in broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.129, p. 107-123, 2009.

REZENDE, C. S. M.; ALMEIDA, T. L.; NICOLAU, E. S.; SOLA, M. C.; MESQUITA, A. Q.; JARDIM, E. A. G. V.; OLIVEIRA, J. C. Presence de *Campylobacter* spp. dans les carcasses et les gesiers de poulets abattus à Goiás, Brésil. In: **Neuvièmes Journées de La Recherche Avicole**, Tours, p.733-736, 2011.