

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

Raphael do Carmo Farias¹, Cíntia Silva Minafra e Rezende², Edmar Soares Nicolau³,
Thatyana Lacerda de Almeida⁴, Marília Cristina Sola⁵, Sandra Queiroz Porto de Mesquita⁶

¹Orientando - rafariasg@gmail.com, 2. Orientador, Doutor, Docente EVZ/UFG -
cintia@cpa.vet.ufg.br, 3. Doutor, Docente EVZ/UFG, 4. Estudante de graduação
EAEA/UFG, 5. Doutorado Ciência Animal, 6. Bióloga, servidor EVZ/UFG.

PALAVRAS-CHAVE: biologia molecular, *Campylobacter* spp., ensaio imunoenzimático, subprodutos avícolas.

1 Introdução

As matrizes alimentares de origem avícola comumente são apontadas como veiculadoras de doenças pela contaminação das carcaças de frango durante as operações de abate. Dentre as etapas de maior associação, pode-se mencionar a etapa de evisceração, quando as aves são abertas e as vísceras, sejam comestíveis ou não, são expostas para a realização da inspeção sanitária.

A carne de frango pode veicular diversas bactérias, entre elas os gêneros *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* e *Campylobacter*. ROSENQUIST et al. (2006) mencionaram que *Campylobacter* tem sido relacionada ao trato gastrointestinal das aves, sendo a evisceração um ponto crítico para disseminação do patógeno. FRANCHIN et al. (2007) identificaram o patógeno, em frigoríficos de Santa Catarina, em amostras de alimentos e ambiente, da ordem de 71,3%. Outra pesquisa realizada em frigorífico na região sul do Brasil identificou a bactéria em cerca de 17% das amostras de superfícies, carnes e vísceras de aves

¹ Orientando - rafariasg@gmail.com, 2. Orientador, Doutor, Docente EVZ/UFG -
cintia@cpa.vet.ufg.br, 3. Doutor, Docente EVZ/UFG, 4. Estudante de graduação EAEA/UFG,
5. Doutorado Ciência Animal, 6. Bióloga, servidor EVZ/UFG.

Revisado pelo Orientador -

colhidas em diferentes pontos da linha de abate e processamento, sendo a maior incidência no conteúdo intestinal do frango (REITER et al., 2005).

Quando amostras originárias do trato gastrointestinal são analisadas, observa-se dificuldade de isolamento e detecção, tendo em vista o alto grau de contaminação. A coexistência de bactérias de gêneros diferentes pode ser determinante para a inatividade daquelas de menor grau de competitividade. A bactéria *Campylobacter*, em algumas situações, não se mantém frente a outros microrganismos, seja pela depleção do ambiente ideal para sua multiplicação ou pela ação de bactérias melhor competidoras. SILVA et al. (2007) descreveram que para a detecção de *Campylobacter* em alimentos, deve ser levado em consideração o fato de que a população presente nos produtos é normalmente baixa, devido ao não crescimento em temperaturas abaixo de 30°C e extrema sensibilidade à concentração de oxigênio do ar (21%). O sucesso da detecção geralmente depende da análise de um número grande de amostras, concentração das células presentes e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas, à temperatura de 42°C, ótima para espécies de interesse em alimentos.

Por estas informações, vale ressaltar que o diagnóstico laboratorial para *Campylobacter* em amostras de origem animal pode ser difícil. 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 vísceras não comestíveis (inglúvio e ceco), comparando as técnicas de PCR em tempo real e VIDAS[®] *Campylobacter*.

2 Metodologia

Foram analisadas 240 amostras provenientes de cinco abatedouros (A, B, C, D e E) do estado de Goiás, compostas por 120 inglúvios (papo) e 120 cecos. 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 4,5 mL transferidos para tubos de polipropileno, com o objetivo de estocar material proveniente de uma mesma amostra para o ensaio de PCR em tempo real.

A análise de PCR em tempo real (BOTTELDOORN et al., 2008) contou com o emprego de 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 $41,5\pm 1$ °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 apresentaram 100% de detecção e identificação pelo PCR em tempo real e pelo ensaio imunoenzimático VIDAS® Campy.

No entanto, quanto feita a avaliação de amostras de ingluvío e ceco observou-se divergência nos resultados, havendo maior detecção pelo ensaio de PCR em tempo real.

Na Tabela 1 pode-se visualizar o percentual de lotes contaminados pelo patógeno.

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

Abatedouro	Lotes positivos/lotes analisados		% de lotes positivos	
	VIDAS® Campy	PCR em tempo real	VIDAS® Campy	PCR em tempo real
A	0/3	0/3	-	-
B	0/3	1/3	-	33,33
C	1/3	2/3	33,33	66,67
D	1/3	1/3	33,33	33,33
E	1/3	1/3	33,33	33,33
TOTAL	3/15	5/15	20	33,33

Dos cinco abatedouros avaliados, três lotes do total de 15 foram positivos para *Campylobacter* spp. pelo ensaio imunoenzimático (VIDAS® Campy). Quando feita a análise por PCR em tempo real, verificou-se que cinco lotes foram positivos.

A distribuição do patógeno em ingluvío e ceco, de lotes destinados ao abate, pode ser visualizada na Tabela 2. Conforme os resultados, 3,75% do total de amostras analisadas pelo método VIDAS® Campy mostraram-se positivas. Considerando o outro método, observou-se que em 8,75% do total teve *Campylobacter* spp. detectada.

Tabela 2 – Distribuição de *Campylobacter* spp. em ingluvío e ceco, de cinco lotes abatidos

Agroindústria	Amostras de carne de aves		% de positivas	
	VIDAS® Campy	PCR em tempo real	VIDAS® Campy	PCR em tempo real
A	0/48	1/48	-	2,10
B	0/48	3/48	-	6,25
C	3/48	5/48	6,25	10,42
D	1/48	5/48	2,10	10,42
E	5/48	6/48	10,42	12,50
TOTAL	9/240	21/240	3,75	8,75

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

Tabela 3 – *Campylobacter* spp. em ingluvíos e cecos de frangos abatidos em Goiás

Categoria de amostra	positivas/ analisadas		Frequência relativa VIDAS® Campy (%)	Frequência relativa PCR tr** (%)
	VIDAS® Campy*	PCR tr**		
Inglúvio (papo)	3/120	6/120	2,50	5,00
Ceco	6/120	15/120	5,00	12,50
TOTAL	9/240	21/240	3,75	8,75

* VIDAS® Campy – ensaio imunoenzimático

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

4 Discussão

Considerando culturas puras, observou-se que as técnicas avaliadas foram de excelente aplicabilidade, pois em 100% das amostras houve a identificação e deteção do gênero. Porém, quando foram avaliadas amostras com alta carga de contaminação, o resultado

foi variável. Este fato pode ser explicado pela menor resistência da bactéria frente a outros microrganismos, possivelmente presentes em estruturas do trato gastrointestinal.

Analisando os dados das Tabelas 1, 2 e 3 pode-se afirmar que *Campylobacter* spp. está presente nos lotes de frangos, maximizando a probabilidade de contaminação do lote e ente lotes, pois o agente foi encontrado em aves que chegaram para os procedimentos de abate. Torna-se prudente afirmar que o agente está em segmentos anatômicos não destinados à alimentação humana, ainda assim o risco de contaminação das aves durante as operações de abate não está diminuído. Por associação, há o risco de contaminação de matérias primas e ingredientes destinados à alimentação animal, perfazendo um ciclo de contaminação de animais alojados e destinados ao consumo humano.

Dentre os prováveis fatores que culminaram na diferença de percentual entre os dois ensaios analíticos avaliados, pode-se inferir que a injúria celular que passam os microrganismos microaerófilos é suficiente para inviabilizar os cultivos seletivos, prejudicando a melhor e maior identificação de *Campylobacter* pelo ensaio VIDAS®. BOTTELDOORN et al. (2008) afirmaram que a detecção do patógeno pelo PCR em tempo real, é superior quando adotadas técnicas cujo cultivo é o principal recurso analítico, ou em que não há a associação de outro método. Neste estudo, todas as amostras destinadas às análises foram incubadas em caldo seletivo nas condições ideais de multiplicação do agente. Porém, os recursos de cada método diferenciaram-se e aquele em que a sequência genômica foi o alvo demonstrou superioridade. Não cabe aqui, mencionar que o PCR em tempo real é melhor que o ensaio imunoenzimático. Vale comentar, que nestas condições de pesquisa, aquele método pode auxiliar de forma eficaz os serviços de inspeção e monitoramento.

A infecção das aves por *Campylobacter* spp. não cursa com sinais clínicos aparentes e por isso é difícil identificar o patógeno nas granjas. A contaminação ocorre pela via horizontal (RAMABU et al., 2004; FRANCHIN et al., 2005). Esta informação reforça a não alteração visual das amostras obtidas no presente estudo. Não se observou lesão em nenhuma das 240 amostras analisadas, no entanto foi possível identificar e detectar a bactérias nas amostras.

Tendo em vista as duas categorias amostrais, pode-se afirmar que o pH do ingluvío pode ser um inibidor da permanência do *Campylobacter* spp. por suas características de exigência para multiplicação (SILVA et al., 2007); o mesmo não acontecendo com o ceco, aumentando a chance de contaminação das carcaças durante a evisceração e inspeção sanitária e do ambiente, como mesas de inspeção, manipuladores e utensílios utilizados selecionados

para inspeção. Estes achados reforçam a necessidade de atenção às etapas de abate, por haver possibilidade de contaminação entre carcaças e do ambiente.

Os achados deste estudo ressaltam que independente de terem sido avaliadas vísceras que não são destinadas à alimentação humana, há risco de exposição do agente no lote, entre lotes, no ambiente, em produtos e subprodutos da cadeia avícola. Tal risco compõe ameaça à segurança alimentar.

5 Conclusão

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

- *Campylobacter* foi identificada em vísceras destinadas à fabricação de alimento animal;
- Observou-se maior frequência do agente em cecos;
- A técnica de PCR em tempo real demonstrou maior percentual de detecção do agente.
- A presença de *Campylobacter* spp. em 3,75% 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.

FRANCHIN, P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, n. 2, p. 157- 162. 2005.

FRANCHIN, P. R.; OGILARI, P. J.; BATISTA, C. R. V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v. 48, n. 2, p. 127-132. 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.

RAMADU, S. S.; BOXALL, N. S.; MADIE, P.; FENWICK, S. G. Some potencial source for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 252-256. 2004.

REITEL, M. G. R.; BUENO, C. M.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Ocurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1903- 1906. 2005.

ROSENQUIST, H.; SOMMER, H. M.; NIELSEN, N. L.; CHRISTENSEN, B. B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 226- 232. 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Campylobacter*. In: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª edição. Cap. 15, p. 201- 212, Ed. Varela. São Paulo, 2007.