

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAQUEL SZYGALSKI BIASI

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Campylobacter* sp.
TERMOFÍLICO NA LINHA DE ABATE DE SUÍNOS EM ABATEDOURO
DO SUL DO BRASIL**

(Occurrence and characterization of termophilic *Campylobacter* sp. in the
slaughter processing of pigs in a slaughterhouse in south of Brazil)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2010

RAQUEL SZYGALSKI BIASI

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Campylobacter*
sp.TERMOFÍLICO NA LINHA DE ABATE DE SUÍNOS EM
ABATEDOURO DO SUL DO BRASIL**

(Occurrence and characterization of termophilic *Campylobacter* sp
in the slaughter processing of pigs in a slaughterhouse in south of
Brazil)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção e
Tecnologia de Produtos de Origem
Animal, ao Centro de Ciências
Agrárias e Ambientais, da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Renata Ernlund
Freitas de Macedo

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2010

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO 1: ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO <i>Campylobacter</i> E SUA RELEVÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA	
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 <i>Campylobacter</i> sp.....	11
2.1 TAXONOMIA.....	11
2.2 <i>Campylobacter</i> sp. TERMOFÍLICO.....	14
2.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i>.....	15
2.2.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	15
2.2.1.2 <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i>	16
2.2.2 <i>Campylobacter coli</i>.....	17
2.2.3 <i>Campylobacter lari</i>.....	18
2.2.4 <i>Campylobacter upsaliensis</i>.....	18
3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
4 PATOGENIA.....	21
4.1 CAMPILOBACTERIOSE.....	21
4.2 SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ.....	22
4.3 ARTRITE REATIVA.....	23
5 METODOLOGIAS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Campylobacter</i> sp.	24
5.1 DETECÇÃO DE <i>Campylobacter</i> sp.	24

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Campylobacter</i> sp.	24
5.2.1 Métodos bioquímicos e enzimáticos.....	25
5.2.2 Reação antígeno anticorpo.....	26
5.2.3 Métodos de diagnóstico molecular.....	28
6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
 CAPÍTULO 2: PREVALÊNCIA DE <i>Campylobacter</i> sp.TERMOFÍLICO NA LINHA DE ABATE DE SUÍNOS EM ABATEDOURO NO SUL DO BRASIL	
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 MATERIAL.....	47
2.2 MÉTODOS.....	50
2.2.1 Procedimento de coleta das amostras.....	50
2.2.2 Análise quantitativa de <i>Campylobacter</i> sp.termofílico.....	50
2.2.3 Análise qualitativa de <i>Campylobacter</i> sp.termofílico.....	51
3 RESULTADOS.....	53
4 DISCUSSÃO.....	55
5 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
 CAPITULO 3 - IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Campylobacter</i> sp. TERMOFÍLICO ISOLADO DURANTE O ABATE DE SUÍNOS	

RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
1 INTRODUÇÃO.....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 PLANO DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	69
2.2 ISOLAMENTO BACTERIANO.....	72
2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS.....	73
2.3.1 Identificação bioquímica por API Campy.....	73
2.3.2 Identificação molecular por PCR em tempo real.....	73
2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	74
3 RESULTADOS.....	75
4 DISCUSSÃO.....	79
5 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85

RESUMO GERAL

RESUMO- Atualmente é freqüente a transmissão de zoonoses através de alimentos, principalmente em surtos alimentares envolvendo *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Listeria* sp. e as espécies enterohemorrágicas de *Escherichia coli*. Há alguns anos, pesquisadores de países desenvolvidos e em desenvolvimento têm observado que o gênero bacteriano que mais causa surtos de gastroenterites em humanos é *Campylobacter* sp. Este gênero é composto por várias espécies de natureza zoonótica que apresentam a forma de bastonete Gram negativo curvo ou espiralado e móvel através de flagelo monopolar ou bipolar monotríquio. Os casos de gastroenterite ocasionados por *Campylobacter* sp. geralmente estão associados ao consumo de carne, leite ou água contaminados. Estudos para a detecção de *Campylobacter* sp. em amostras oriundas de aves tem sido relatados, porém na suinocultura pouco se sabe sobre os níveis de contaminação por este patógeno. O presente trabalho teve como objetivo a pesquisa da prevalência de *Campylobacter* sp. em carcaças suínas durante o abate, a identificação das cepas e resistência a antibióticos dos isolados encontrados. Neste estudo, do total de 259 amostras coletadas em diferentes etapas da linha de abate de suínos, verificou-se que apenas 9 amostras (3,5%) apresentaram crescimento nos meios de cultura específicos para *Campylobacter* sp. Das amostras positivas, 5 (55,6%) foram isoladas após a escalda e depilação mecânica das carcaças, demonstrando que essas etapas do abate de suínos são críticas para a contaminação por *Campylobacter* sp., provavelmente devido à baixa frequência de renovação da água do tanque de escalda e/ou má higienização dos dedos de borracha da depiladora. A ocorrência de *Campylobacter* sp. mostrou-se relacionada principalmente à contaminação cruzada durante algumas etapas do abate. Dos isolados de *Campylobacter* foram identificadas bioquimicamente cepas pertencentes aos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter*, sendo 33,3% pertencentes à espécie *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, 33,3% *Campylobacter coli*, 22,3% *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei* e 11,1% *Arcobacter cryoaerophilus*. Porém, na confirmação molecular das cepas, todas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. Todos os isolados mostraram multi-resistência antimicrobiana, sendo resistentes ao ácido nalidíxico, cefalotina, clindamicina, ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina, norfloxacina, tetraciclina e trimetropina, podendo representar perigo para a saúde pública. Apenas 3 antimicrobianos, amoxicilina associada a ácido clavulânico, ampicilina e cloranfenicol mostraram inibição a todos os isolados. Os resultados obtidos mostraram que apesar das baixas contagens de *Campylobacter* sp. e da baixa frequência de isolamento nas amostras avaliadas, todas as cepas apresentaram multi-resistência antimicrobiana e que por tratar-se de patógeno humano emergente, o risco de contaminação por *Campylobacter* sp. pelo consumo de carne suína não deve ser desprezado.

Palavras – chave: *Campylobacter*, prevalência, resistência antimicrobiana, reação de polimerase em cadeia.

ABSTRACT- Currently is frequent transmission of zoonosis through food, the main bacteria involved are *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Listeria* sp. and enterohaemorrhagic species of *Escherichia coli*. Recently researchers from around the world has concluded that the genus of bacteria that causes the most outbreaks of gastroenteritis in humans is *Campylobacter* sp. This genus is composed of several species of zoonotic nature that have a rod-shaped, Gram-negative, curved or spiral, moving through scourge monopolar or bipolar monotríquio. Cases of gastroenteritis are caused by *Campylobacter* sp. is usually associated with the consumption of meat, milk or water. Studies for the detection of *Campylobacter* sp. in samples from broilers have been developed for some time, but in the swine, little is known about the levels of contamination by this pathogen both in the question on the qualitative and quantitative. This dissertation aimed to study of prevalence of *Campylobacter* sp. in the processing line for the slaughter of pigs and analyze the identification and antibiotic resistance of isolates found. In this study, a total of 259 samples collected at different stages in of the pig processing of slaughtering. It was found that only 9 samples (3.5%) increased in culture-specific determination of *Campylobacter* sp. Of the positive samples, 5 samples (55.6%) were isolated after the scalding and mechanical removal of carcasses, demonstrating that these are critical steps in the slaughter of pigs for contamination with *Campylobacter* sp., probably due to the low frequency of renewal of water tank of scalding and / or poor hygiene of the fingers of rubber epilator. The occurrence of *Campylobacter* sp. was low in the refrigerator swine carcasses evaluated, mainly related to cross-contamination during some stages of the slaughter. The identification of isolates by phenotypic method showed 33.3% belong to the species *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, other *Campylobacter coli* 33.3%, 22.3% and *Campylobacter jejuni* subsp. *Doyle* and 11.1% as *Arcobacter cryoaerophilus*, but the methodology analysis for genotypic identified that all isolates belonged to the genus *Campylobacter*, indicating that improvements in methodologies are needed. These isolates were identified as belonging to the genus of *Campylobacter* and *Arcobacter*. All the isolates showed multidrug resistance, being resistant to cephalothin, clindamycin, ciprofloxacin, nalidixic acid, norfloxacin, tetracycline, trimethoprim and streptomycin and gentamicin can pose a hazard to public health. Only 3 antimicrobials, amoxicillin combined with clavulanic acid, ampicillin and chloramphenicol, showed inhibition of all isolates. The results showed that despite the small number of cells of *Campylobacter* sp. And the low frequency of isolation in the samples, all strains were multi-antibiotic resistance and because it is an emergent human pathogen, the risk of contamination by *Campylobacter* sp. by pork meat should not be overlooked.

Key – words: *Campylobacter* sp., prevalence, antimicrobial resistance to antibiotics, polimerase chain reaction.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Campylobacter* E SUA RELEVANCIA NA SAÚDE PÚBLICA

*(Overview of the genus Campylobacter sp. and its impact in public
health)*

ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO *Campylobacter* E SUA RELEVANCIA NA SAÚDE PÚBLICA

(*Overview of the genus Campylobacter sp. and its impact in public health*)

¹ Raquel Szygalski Biasi; ² Renata Ernlund Freitas de Macedo

¹ Médica Veterinária, Mestranda do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, quel_biasi@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, Professora do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, renata.macedo@pucpr.br

RESUMO- Há alguns anos, pesquisadores de vários países têm apontado o gênero *Campylobacter* sp. como o maior causador de surtos de gastroenterites em humanos. Este gênero é composto por várias espécies de natureza zoonótica que apresentam a forma de bastonete Gram negativo curvo ou espiralado e móvel através de flagelo monopolar ou bipolar monotríquio. Os casos de gastroenterite ocasionados por *Campylobacter* geralmente estão associados ao consumo de carne, leite ou água contaminados. Além de ser considerado um patógeno emergente, diversos trabalhos científicos sobre *Campylobacter* apontaram outras questões relevantes sobre o gênero como a resistência a antibióticos e a dificuldade em diagnosticar corretamente a espécie causadora das patologias. Todos estes fatores tornam o gênero *Campylobacter* um importante alvo de estudos em diversos países desenvolvidos com a finalidade de preservar a saúde pública. Esta revisão teve como objetivo auxiliar no entendimento do gênero *Campylobacter* e de sua relevância para a saúde pública.

Palavras-chave: *Campylobacter*, patogenia, epidemiologia

ABSTRACT- Few years ago researchers from developed and developing countries has concluded that the bacterial genus that causes the most outbreaks of gastroenteritis in humans is *Campylobacter* sp. This genus is composed of several species of zoonotic nature that have a rod-shaped Gram-negative curved or spiral, moving through scourge monopolar or bipolar. Cases of gastroenteritis caused by *Campylobacter* sp. usually associated with the consumption of meat, milk or water. In addition to being considered an emerging pathogen, studies have recorded the resistance of microorganisms to various antibiotics and difficult to diagnose correctly the causative species of pathologies. All these factors make the *Campylobacter* sp. an important target of study and research for various agencies in order to ensure public health. This review aims to assist in understanding with respect to *Campylobacter* and its relevance to public health.

Keywords: *Campylobacter*, pathogenesis, epidemiology

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança dos alimentos cresce a cada dia e o controle de micro-organismos faz-se essencial na redução de enfermidades veiculadas pelos alimentos, especialmente pela carne, que constitui importante fonte de proteínas na dieta humana e é vista como um ótimo meio de crescimento microbiano, uma vez que os micro-organismos são capazes de realizar muitas reações químicas complexas essenciais para sua perpetuação, obtendo nutrientes da matéria orgânica que constitui os suplementos alimentares (JAY, 2005).

Essa preocupação gera novas exigências dentre as quais o controle de micro-organismos patogênicos já conhecidos e outros considerados emergentes (Diretiva 2003/99/EC da União Européia). Tais micro-organismos são causadores de doenças gastrintestinais importantes no mundo todo.

Na indústria de alimentos, *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. representam as maiores causas de doenças de origem alimentar no ser humano (FRANCHIN et al., 2005; GHAFIR et al., 2007), sendo o gênero *Salmonella* considerado durante muito tempo como o principal responsável por esse tipo de enfermidade. Contudo, na primeira década do ano 2000, vários pesquisadores têm registrado o aumento na prevalência de *Campylobacter*, apontando esse patógeno como o maior causador de patologias alimentares em humanos (PEZZOTTI et al., 2003; GUÉVREMONT et al., 2006; BARDON et al., 2009).

Devido à relevância do gênero *Campylobacter* em transtornos gastrintestinais alimentares e da preocupação com a inocuidade dos alimentos, este estudo teve como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica sobre o gênero *Campylobacter* e mostrar sua implicação na saúde pública.

2 *Campylobacter* sp.

2.1 TAXONOMIA

O gênero *Campylobacter* é composto por várias espécies de natureza zoonótica, sendo amplamente distribuído em animais de sangue quente,

domésticos e silvestres como frangos, suínos, ovinos, bovinos, cães e gatos (SILVA et al., 2007). Segundo Jay (2005), atualmente cerca de quatorze espécies compõem este gênero, que é mais próximo do gênero *Arcobacter* sp. do que qualquer outro. O micro-organismo foi descrito pela primeira vez em 1886 por Escherich, mas somente na década de 70 adquiriu importância devido à patogenicidade de algumas espécies causadoras de diarreia nos seres humanos (TRABULSI et al., 1999).

As espécies de *Campylobacter* foram incluídas no atual gênero em 1963 (ADAMS; MOSS, 1997). Previamente, eram classificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, sendo reorganizadas após inúmeras pesquisas que empregaram técnicas moleculares, incluindo hibridização DNA – RNA, análises de sequência do RNA ribossômico (RNAr) 16S e análises de imunotipagem (WINN et al., 2008) para a identificação das espécies.

Em culturas jovens, estes micro-organismos apresentam a forma de bastonetes Gram negativos curvos ou espiralados, móveis por flagelo monopolar ou bipolar monotríquio, apresentando movimento em forma de “saca-rolha” ou “vaivém” e quando observados aos pares, adquirem o aspecto de “asa de gaivota” ou a forma de “S” (SILVA et al., 2007). Em culturas de vários dias, a morfologia cocóide é adquirida, sendo caracterizados por não possuírem a habilidade de esporular (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

São incapazes de se proliferar na presença de ar atmosférico, necessitando para o seu crescimento tensões de oxigênio de 5 a 6%, e por serem também considerados capnófilos, necessitam de cerca de 10% de gás carbônico. Estas exigências de atmosfera definem o gênero *Campylobacter* como microaerófilo (JAY, 2005). Segundo Franco e Landgraf (1996), o crescimento destes micro-organismos é inibido quando a concentração de oxigênio é menor que 3% e maior que 15%.

Seu metabolismo energético os classifica como quimiorganotróficos, por não fermentarem e nem oxidarem açúcares, obtendo sua energia a partir de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido carboxílico; possuem reação de catalase variável, oxidase e redução de nitrato positivas, são altamente sensíveis ao sal não conseguindo se multiplicar em meios que contêm 2% de NaCl a 30°C e mostram-se sensíveis a 4 °C em meios com 1% de NaCl (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Quando submetidos ao congelamento, resfriamento ou pH reduzido, sua viabilidade diminui consideravelmente (ADAMS; MOSS, 1997), sendo a faixa de pH adequada para crescimento de valores próximos a pH 5 (Jay, 2005) (Figura 1).

Ao contrário do gênero *Salmonella* que sobrevive bem fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente, este gênero é menos adaptado à vida extra intestinal (OLIVO, 2006).

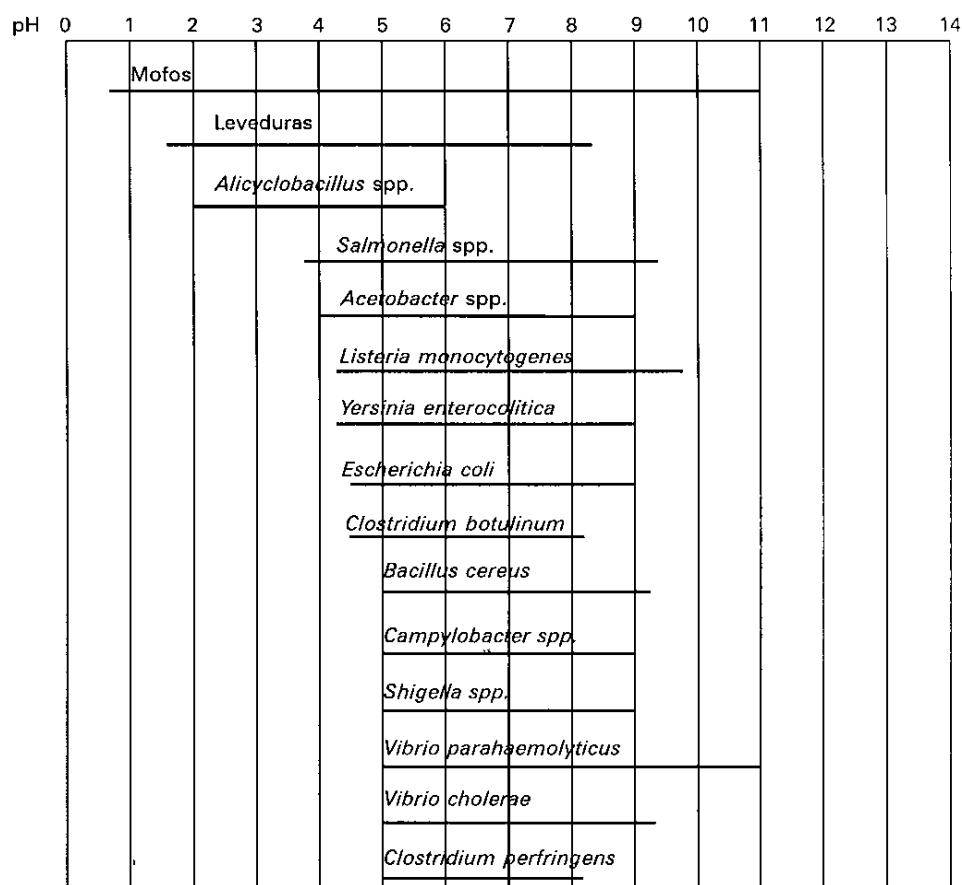


Figura 1 – Faixa aproximada de pH de crescimento de alguns micro-organismos encontrados em alimentos.

Fonte: JAY, 2005.

Dentre todas as espécies de *Campylobacter*, aquelas associadas às doenças transmitidas por alimentos constituem um grupo distinto, chamadas de termofílicas (SILVA et al., 2007).

2.2 *Campylobacter* sp. TERMOFÍLICO

No grupo de *Campylobacter* termotolerantes estão incluídas as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Estas diferenciam-se das demais espécies por apresentarem temperatura ótima de multiplicação na faixa dos 42 a 43°C e não se multiplicarem a 30°C (SILVA et al., 2007), entre outras características específicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Reações bioquímicas e de crescimento utilizadas na identificação de espécies de *Campylobacter* sp. termófilos.

Testes	<i>C. jejuni</i> <i>Jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> <i>Doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C.</i> <i>upsaliensis</i>
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	M	+	+	-
Uréase	-	-	-	V	-
H ₂ S	-	-	F	-	-
Indoxil acetato	+	+	+	-	+
Hipurato	+	+	-	-	-
Nitrato	+	-	+	+	+
Crescimento 25°C	-	-	-	-	-
Crescimento 42°C	+	-	+	+	M
Crescimento 2% bile	M	-	M	+	+
Crescimento 2% NaCl	-	-	-	M	-
Crescimento 1% glicina	M	F	+	+	+

Símbolos: + = 95-100% das cepas positivas, - = 0-11% das cepas positivas, V = variável, F = 14-50% das cepas positivas, M = 60-93% das cepas positivas.

Fonte: SILVA et al., 2007.

Segundo Franco e Landgraf (1996), embora várias espécies de *Campylobacter* estejam associadas a doenças, aquelas frequentemente isoladas em casos de gastroenterite humana são *C. jejuni*, *C. lari* e *C. coli*.

Em países desenvolvidos, dados recentes mostram que *Campylobacter* termotolerantes, principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, apresentam-se como os principais micro-organismos causadores de diarreia em adultos. O mesmo quadro clínico é observado em crianças nos países em desenvolvimento (WORKMAN et al., 2008).

2.2.1 *Campylobacter jejuni*

Dentre todas as espécies de *Campylobacter* termotolerantes, *C. jejuni* é a espécie mais recorrente nos casos de gastroenterites em humanos (FORSYTHE, 2002). Também é frequentemente isolada em amostras oriundas de animais, tendo sido encontrada em 46% dos isolados de frangos na República Tcheca (BARDON et al., 2009), 85,7% dos isolados de frangos, suínos e bovinos na Bélgica (GHAFIR et al., 2007), 34,1% de amostras ovinas na Turquia (AÇIK et al., 2006), 14,25% dos isolados de frango no mesmo país (ERTAS et al., 2004) e 37,74% dos isolados de carne de frango na Coreia do Sul (HAN et al., 2007) entre outras prevalências registradas por outros pesquisadores.

Como características específicas apresenta reações de catalase e oxidase positivas, diferindo de *C. coli* por ser capaz de hidrolisar hipurato (SILVA et al., 2007).

Esta espécie subdivide-se em duas subespécies, *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* e *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei*.

2.2.1.1 *Campylobacter jejuni* subs. *Jejuni*

A subespécie *jejuni*, é resistente à cefalotina, cresce a 42°C e pode reduzir nitratos. Sua importância como patógeno alimentar fez dessa subespécie a primeira do grupo a ter seu genoma seqüenciado, deflagrando seu 1,64 milhão de bases. Seu crescimento é interrompido quando submetido à

presença de 3,5% de NaCl ou a temperatura de 25°C e inibido com 21% de oxigênio. Morfologicamente apresenta-se como um bastonete fino, encurvado em espiral, com um único flagelo polar em uma ou ambas as extremidades. Não se trata de um organismo ambiental, sendo associado a animais de sangue quente, principalmente os de corte que demonstraram conter este micro-organismo em suas fezes (prevalência de 30 a 100% das amostras), sendo mais proeminente em aves domésticas (JAY, 2005).

Não é uma espécie termorresistente, estando sua temperatura de crescimento entre 32 e 45°C, não demonstrando crescimento a 47°C. Seu pH ótimo varia entre 6,5 e 7,5, sendo o pH máximo entre 9,0 e 9,5; não cresce em pH 4,7 e morre rapidamente em pH 4,0. Quando submetido à refrigeração (4°C) sobrevive de duas a quatro semanas, se forem garantidas baixas tensões de oxigênio e proteção contra perda de umidade. Nas mesmas condições pode sobreviver de dois a cinco meses a 20°C negativos (SILVA et al., 2007).

Por ser considerada a subespécie que mais causa enfermidades em humanos, muitos autores a tratam nominalmente apenas por *Campylobacter jejuni*.

2.2.1.2 *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei*

As primeiras descrições desta subespécie ocorreram em 1985 na Europa e posteriormente na Austrália e na África, inicialmente denominado como GCLO-2 (*Gastric Campylobacter like organisms type 2*). Este micro-organismo também apresenta um único flagelo em uma ou nas duas extremidades, depende da atmosfera microaerófila para seu desenvolvimento e tem sido isolado do epitélio gástrico em pacientes com úlcera gástrica e gastrite crônica ativa, assim como nas fezes de crianças com diarreia (TRABULSI et al., 1999).

Segundo Steele et al. (1988), esta subespécie possui crescimento lento a 35-37°C (temperatura ótima), prolifera-se pobremente a 30°C ou a 42°C e pode ser facilmente distinguida de *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* por sua inabilidade em reduzir nitrato.

Não demonstra crescimento em ágar Mac Conkey assim como mostra-se susceptível a ácido nalidíxico e cefalotina. Por conseguinte, não é isolada em meios que contenham estes antibióticos (WINN et al., 2008).

Em 2003, Fernández et al. descreveram pela primeira vez um caso de diarreia aguda causada por *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei* em um paciente com menos de dois anos de idade no Chile, que apresentava diarreia extremamente aquosa, desidratação, febre e vômito.

Os registros patogênicos gerados por esta subespécie em humanos ainda são raros, deixando assim ainda pouco conhecida sua capacidade em causar enfermidades.

2.2.2 *Campylobacter coli*

Quando comparada à espécie *Campylobacter jejuni*, não são apontadas grandes diferenças entre as duas espécies, tanto em relação à patogenicidade e composição antigênica quanto às características epidemiológicas relacionadas com a forma de transmissão e sua distribuição em animais (TRABULSI et al., 1999). Em estudo realizado por Engvall et al. (2002), ambas as espécies não demonstraram crescimento sob atmosfera microaerófila em uma faixa de temperatura entre 15°C e 30°C, obtendo -se o mesmo resultado em anaerobiose com temperatura entre 30°C e 37°C.

O critério mais utilizado para diferenciação entre essas duas espécies é a capacidade de hidrolisar hipurato¹, não conferida ao *Campylobacter coli* (JAY, 2005).

C. coli pode ser isolado de suínos, bovinos, ovinos e aves, causa gastroenterite, septicemia e aborto em humanos. Em animais é responsável por quadros de gastroenterites em suínos e macacos e aborto em roedores (EUZÉBY, 2009).

Campylobacter coli é considerada a segunda espécie com maior frequência de isolamento, como foi observado por Sáenz et al. (2000); Rönner et al. (2004) e Little et al. (2008). Porém algumas vezes também é visto como o

¹ Sal do ácido hipúrico.

micro-organismo mais isolado do gênero como registraram Modolo et al. (1999) e Shin e Lee (2007) especialmente quando associado a amostras de origem suína como observado por Ono et al. (1999) que relataram 82,5% das amostras contaminadas por *Campylobacter coli*.

2.2.3 *Campylobacter lari*

A espécie, anteriormente denominada *Campylobacter laridis*, é conhecida como agente de diarreia e septicemia em humanos, embora sua frequência de isolamento seja menor que de *Campylobacter coli* (TRABULSI et al., 1999). Também é conhecida como causadora de gastroenterite em aves. Para Franco e Landgraf (1996) esta espécie comporta-se de forma semelhante a *C. jejuni* com relação à doença que provoca.

As fontes de isolamento atingem várias espécies animais incluindo aves, suínos, cães, gatos, visons, coelhos e insetos, podendo também ser isolada na água (EUZÉBY, 2009).

Segundo Winn et al. (2008), *Campylobacter lari* é endêmico em gaivotas marinhas, porém é um patógeno humano infrequente. Para auxiliar na distinção desta espécie em relação às demais, testes como de crescimento em anaerobiose e na presença de óxido de trimetilamina são utilizados. Além desses, testes de resistência ao ácido nalidíxico e cefalotina são utilizados por muitos laboratórios para diferenciar do *C. jejuni* e *C. coli*.

2.2.4 *Campylobacter upsaliensis*

Esse micro-organismo compartilha várias características com as demais espécies de *Campylobacter*. A princípio, era denominado como grupo catalase negativa/ catalase fraca (CNW – catalase negative/ *catalase weak*). Foi descrito pela primeira vez, oriundo de amostras humanas, por Steele et al. (1988) em 1985 na Austrália. Anteriormente, havia sido isolado de amostras de fezes de cães em Uppsala na Suécia por Sandstedt et al. em 1983.

Segundo Bourke et al. (1998), esta espécie exibe, quando observada sobre microscopia com contraste de fase, o movimento típico de seu gênero,

com medidas de 0,3 a 0,4 µm de largura e 1,2 a 3 µm de comprimento. Quando cultivada em ágar sangue apresenta colônias pequenas em tom acinzentado ou translúcidas.

Como características específicas, apresenta ausência de crescimento em ágar Mac Conkey e na presença de 0,1% de óxido de trimetilamina também é altamente sensível a fármacos comumente utilizados em meios seletivos (WINN; KONEMAN, 2008).

Pesquisadores como Labarca et al. (2002) perceberam que a contaminação por *Campylobacter upsaliensis* pode ser maior do que a registrada. Em seus estudos com amostras humanas este micro-organismo foi o segundo mais recorrente, os pesquisadores atribuíram o baixo número de registros desta espécie às condições de cultivo e aos meios de cultura normalmente utilizados.

Previamente à Labarca et al. (2002), outros pesquisadores como Goossenes et al. (1990), Lastovica e LeRoux (1993) e Lindblom et al. (1995) já haviam isolado cepas desta espécie com maior frequência do que *C. coli* e dos demais enteropatógenos humanos conhecidos.

Suas fontes de isolamento apresentam maior incidência em animais domésticos como cães e gatos além do homem. Neste, é responsável por causar gastroenterite, septicemia, abscessos e aborto. Naqueles é conhecido como causador apenas de gastroenterite (EUZÉBY, 2009).

3 EPIDEMIOLOGIA

Ainda que a campilobacteriose não esteja associada a altas taxas de mortalidade e que seja normalmente auto-limitada, ela gera importante impacto econômico e na saúde pública dos países mais industrializados (JOSEFSEN et al., 2004). No Brasil, há poucos estudos sobre a incidência de *Campylobacter* em alimentos. Segundo dados de Scarcelli et al. (2005), cerca de 25% dos casos de diarreia no estado de São Paulo estão relacionadas à campilobacteriose.

Segundo a WHO (*World Health Organization*, [2009]) *Campylobacter* sp. é a bactéria que mais causa quadros de diarreia em humanos, causando gastroenterite e superando o número de caso de enfermidades alimentares

geradas por *Salmonella*. São frequentes os relatos de infecções por *Campylobacter* em crianças menores de dois anos em países em desenvolvimento, resultando algumas vezes em morte e em quase todos os países desenvolvidos observa-se crescimento no número de casos de infecções por este micro-organismo.

Para Ghafir et al. (2008), a ocorrência de *Campylobacter* em alimentos mostra-se bastante freqüente em países da Europa, tornando esse micro-organismo um dos principais patógenos causadores de enfermidades de origem alimentar, juntamente com *Salmonella* sp., nos países industrializados.

Segundo Pezzotti et al. (2003) *Campylobacter jejuni* é a espécie mais comumente isolada em enfermidades alimentares causadoras de diarreia aguda. Os produtos de origem animal, especialmente carne de frango e leite cru são reconhecidos como os veículos primários de contaminação por *Campylobacter*, visto que esse gênero ocorre com freqüência em frangos, bovinos e suínos.

Em um estudo realizado por Van Nierop et al. (2005) em Gauteng na África do Sul, observou-se que a contaminação por *Campylobacter* em frango comercializado fresco em supermercados e por vendedores de rua, era maior do que a contaminação por *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes*. Ono e Yamamoto (1999) verificaram em Saitama no Japão, que a contaminação por *Campylobacter jejuni* em abatedouros de aves após a evisceração chegava a 77,8% e que a cada ano, mais de cinco mil casos de infecções alimentares em humanos, causadas por este micro-organismo, eram registradas no país.

Little et al. (2008) verificaram que a contaminação de carnes vermelhas por *Campylobacter* no Reino Unido era maior que a contaminação das mesmas por *Salmonella*.

Segundo Murray et al. (1995) a incidência de campilobacteriose nos Estados Unidos em 1995 estava estimada em cerca de 1.000 casos a cada 100.000 pessoas. Em 2002, segundo Forsythe (2002), o custo anual com saúde pública devido ao gênero *Campylobacter* no mesmo país, era estimado em 1,3 até 6,2 bilhões de dólares ao ano.

4 PATOGENIA

Por apresentar variadas espécies, o gênero *Campylobacter* é responsável por causar enfermidades em diferentes órgãos de diferentes espécies animais.

Em cães e gatos, foram observados casos de diarreia causada por *Campylobacter upsaliensis* e *Campylobacter helveticus*. Por sua vez, cepas de *Campylobacter sputorum* subsp. *Fecalis* foram isoladas a partir de casos de dermatite digital bovina (QUINN et al., 2005).

Trabulsi et al. (1999) relatam casos de ileíte proliferativa em suínos relacionados a *Campylobacter hyointestinalis* e gengivite e enfermidade periodontal em pacientes contaminados com *Campylobacter concisus*.

Suínos também apresentam quadros de disenteria quando afetados por *Campylobacter coli* (CARTER et al., 1995).

Campylobacter fetus subsp. *Fetus* é responsável por causar infertilidade e aborto em diversos animais (QUINN et al., 2005), mais especificamente em bovinos e ovinos, nos quais causa inflamação do útero, endometrite e aborto. Nos machos bovinos uma diminuição do condicionamento físico também é verificada (HIRSH; ZEE, 2003).

O grupo de espécies termofílicas de *Campylobacter* é responsável por uma série de patologias de origem alimentar, estando relacionados a esses micro-organismos outros quadros clínicos em humanos, além dos casos de campilobacteriose.

4.1 CAMPILOBACTERIOSE

O quadro clínico clássico gerado por *Campylobacter*, em especial *C. jejuni*, denominado campilobacteriose ou enterite campilobacteriana, ocorre cerca de dois a cinco dias após a infecção e tem como sintomas, diarreia (acompanhada ou não de sangue), dor abdominal, náuseas, vômito, dor de cabeça e febre, persistindo os sintomas por um período de três a seis dias (WHO, [2009]; CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY [2009]).

Segundo Adams e Moss (1997) e Silva et al. (2007), a dose infectiva é baixa, estimando-se que a ingestão de 400 a 500 células possa provocar a doença.

Normalmente não se utilizam medicamentos no tratamento humano da campilobacteriose, consistindo apenas de hidratação por se tratar de uma doença auto limitante (RÖNNER et al., 2004; SHIN; LEE, 2007; LITTLE et al., 2008). Porém, quando se faz necessário, os antibióticos utilizados para o tratamento são gentamicina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina (TRABULSI et al., 1999), sendo a eritromicina considerada a droga de escolha (GUÉVREMONT et al., 2006).

A infecção pode acometer pessoas de todas as idades, embora crianças menores de 5 anos e jovens entre 15 e 29 são os mais afetados. A ocorrência deve ser notificada às autoridades de vigilância epidemiológica municipal, regional ou central para que as devidas medidas de controle e prevenção sejam tomadas (Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, [2009]).

4.2 SÍNDROME DE GUILLAIN- BARRÉ

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma desordem dos nervos periféricos caracterizada por acessos de paralisia, sendo considerada uma importante desordem clínica tanto em países desenvolvidos como naqueles ainda em desenvolvimento (BLASER et al., 1997). Desde a redução no número de casos de poliomelite, a SGB é considerada a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda, afetando de 1 a 2 em cada 100.000 pessoas por ano em diversas partes do mundo.

Casos de SGB associados a *Campylobacter* vêm sendo registrados em diferentes países como Índia (SHINA et al., 2004), Canadá (GODSCHALK et al., 2007), Inglaterra (TAM et al., 2003), Itália (CAPORALE et al., 2006), Japão, Alemanha e Estados Unidos (ALLOS et al., 1998).

Cerca de dois terços dos casos de SGB são precedidos por alguns dias ou semanas de infecção respiratória ou intestinal agudas e nestes casos, o micro-organismo com maior frequência de isolamento é *Campylobacter jejuni* (TAM et al., 2003).

Os sintomas da síndrome são fraqueza e disestesia¹ das pernas, que subsequentemente atinge os braços e toda parte superior do corpo. A maioria dos pacientes recupera-se completamente dentro de duas a três semanas. Entretanto, em alguns casos podem permanecer severos danos neurológicos, onde se faz necessária a respiração assistida, podendo resultar em óbito (BOLAN et al., 2007).

A etiologia da Síndrome de Guillian-Barré ainda não está bem elucidada. A hipótese mais provável entre a relação de *Campylobacter* com a síndrome é a produção pelo organismo de anticorpos lipopolissacarídeos, como resultado da infecção pela bactéria, que por mimetismo celular promovem uma reação cruzada com os gangliosídeos ou outras estruturas presentes nos nervos periféricos gerando assim todos os sintomas (CAPOREALE et al., 2006).

4.3 ARTRITE REATIVA

A artrite reativa costuma ocorrer entre duas a quatro semanas após uma infecção à distância, geralmente localizada no intestino ou no trato geniturinário, caracterizando-se por uma inflamação asséptica das membranas sinoviais (sinovite), onde o principal sintoma observado é o aumento difuso da articulação acometida. Em 60% dos casos é auto-limitada. Recaídas são observadas em cerca de 15% dos casos e cronificações em outros 15%. Quando o prognóstico é considerado bom, o tratamento é realizado com antiinflamatórios não esteroidais (MEDICINA GERIÁTRICA, [2009]).

Há muitos anos, casos de artrite reativa são atribuídos a infecções por *Campylobacter* sp. Van de Putte et al. em 1980 e Gumpel et al. em 1981, faziam tal afirmação. Estes autores ainda concluíram que o número de casos desta enfermidade gerados por *Campylobacter* era equivalente aos causados por *Salmonella*.

Recentemente, Smith (2002) afirmou que a enterite por *Campylobacter jejuni* é causa de aproximadamente 2% dos quadros clínicos de artrite reativa,

¹ Enfraquecimento ou perda de algum dos sentidos, em especial, o tato.

contudo Hannu et al. (2002) atribuíram uma porcentagem maior (7%) a esta afirmação segundo pesquisa realizada no mesmo ano na Finlândia.

5 METODOLOGIAS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* sp.

5.1 DETECÇÃO DE *Campylobacter* sp.

Para a detecção de *Campylobacter* sp., a partir da metodologia recomendada pela ISO (*International Organization for Standardization*), são utilizados meios para diluição (água peptonada tamponada), enriquecimento (caldo Bolton), inoculação (ágar Abeyte-Hunt-Bark ou ágar *Campylobacter* Charcoal Diferencial Modificado), incubação (sob microaerofilia, $41,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas), seleção (ágar sangue ou ágar Müller- Hinton) e confirmação das amostras. As indicações para isolamento sugeridas por outros órgãos como a Comissão das Comunidades Europeias por meio da Diretiva 2007/516/CE, *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) não apresentam muitas diferenças de princípios metodológicos.

Alguns pesquisadores como Franchin et al. (2005) realizaram modificações nos meios de cultura disponíveis no mercado para garantir melhor isolamento de *Campylobacter* uma vez que devido à sua sensibilidade, o cultivo e o isolamento desse micro-organismo pode se tornar difícil.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* sp.

Duas metodologias de identificação vêm sendo usadas de forma mais constante, uma baseada em testes bioquímicos e enzimáticos e outra em métodos utilizando diagnóstico molecular.

5.2.1 Métodos bioquímicos e enzimáticos

Os testes bioquímicos e enzimáticos ainda são muito utilizados por laboratórios comerciais e em pesquisas (VAN NIEROP et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2006; OLAH et al., 2006) para a identificação das espécies de *Campylobacter* sp. Dentre eles, os mais utilizados são a reação de catalase, reação de oxidase, hidrólise de hipurato e indoxil acetato, geralmente associados a testes auxiliares como a motilidade e coloração de Gram. Estes testes de confirmação são recomendados pela ISO 10272-1:2006(E).

Também estão disponíveis no mercado sistemas de identificação de micro-organismos como o API Campy (Biomérieux®) (Figura 2), um kit composto por teste de urease, redução de nitratos, esterase, hipurato, gama glutamil transferase, redução do cloreto de trifetil-tetrazolium, pirrolidonil arilamilase, L-arginina arilamidase, L-aspartato arilamidase, fosfatase alcalina, produção de H₂S, assimilação de D-glucose, assimilação de succinato de sódio, assimilação de acetato de sódio, assimilação de propionato, assimilação de malato, assimilação de citrato de trisódio e sensibilidade à eritromicina. Esse kit é capaz de determinar espécies dos gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*.

O sistema API, desenvolvido há mais de trinta anos e baseado no conceito da identificação numérica é considerado o método de identificação de micro-organismos por meio de provas bioquímicas e enzimáticas mais completo dentre todos os existentes nesta gama de produtos, sendo produzidos conforme as normas exigidas pelo *Food and Drug Administration*, normas da ISO 9001 e farmacopéias americanas, européias e japonesas (Biomérieux, 2010).



Figura 2 – Galeria de testes bioquímicos e enzimáticos Api Campy (Biomérieux®).

URE, teste de uréase; NIT, redução de nitratos; EST, esterase; HIP, hipurato; GGT, gama glutamil transferase; TTC, redução do cloreto de trifetil-tetrazolium; PyrA, pirrolidonil arilamilase; ArgA, L-arginina arilamidase; AspA, aspartato arilamidase; PAL, fosfatase alcalina; H₂S, produção de H₂S; GLU, assimilação de D-glucose; SUT, assimilação de succinato de sódio; NAL, resistência ao ácido nalidíxico; CFZ, resistência à cefazolina de sódio; ACE, assimilação de acetato de sódio; PROP, assimilação de propionato; MLT, assimilação de malato; CIT, assimilação de citrato de trisódio; ERO, sensibilidade à eritromicina.

5.2.2 Reação antígeno anticorpo

A identificação de *Campylobacter* no nível de gênero pode ser facilmente conseguida utilizando-se testes rápidos como o de aglutinação em látex (Oxoid) ou a imunocromatografia rápida (Singlepath – Merck).

O teste de látex é utilizado para a identificação de *Campylobacter* enteropatogênicos previamente isolados em meio de cultura sólido. O resultado positivo ocorre pela aglutinação devido à reação antígeno anticorpo entre o micro-organismo presente na amostra e o anticorpo contido no látex, como pode ser observado na Figura 3.

Amostras contaminadas com *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* e *Campylobacter upsaliensis* apresentam resultado positivo caracterizado por aglutinação, enquanto isolados contendo outros tipos de *Campylobacter* como *Campylobacter fetus* subsp. *Fetus* demonstram resultado variável.



Figura 3 – Reação de látex positiva para *Campylobacter* sp.

O teste de imunocromatografia rápida também consiste de uma reação antígeno anticorpo. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de uma tarja vermelha na área onde o anticorpo está contido (Figura 4). Trata-se de um teste rápido, pois o resultado é obtido em 20 minutos, necessitando previamente apenas um enriquecimento e incubação da amostra por 48 horas. Seu limite de detecção depende do sorogrupo contido na amostra podendo este variar entre 10^4 a 10^7 UFC/ mL.



Figura 4 – Reação de imunocromatografia rápida positiva para *Campylobacter* observada pela linha vermelha formada ao lado da letra “T” indicativa da área de realização do teste.

Fonte: MERCK, [2009].

5.2.3 Métodos de diagnóstico molecular

Como alternativa aos métodos convencionais de discriminação de espécies, a reação de polimerase em cadeia (PCR) surge como uma opção, uma vez que os métodos convencionais muitas vezes mostram-se trabalhosos, tediosos e com frequência deflagram resultados inconsistentes.

A PCR é um método de amplificação de DNA sem a necessidade do organismo vivo. Este método foi criado em 1983 e desde então, vem sendo cada vez mais utilizado e aperfeiçoado, surgindo assim uma gama de diferentes metodologias para a identificação de micro-organismos em diversos níveis taxonômicos (NICHOLAS, 1999).

Trabalhos com PCR em amostras contendo *Campylobacter* são cada vez mais freqüentes, seja utilizando técnicas como o PCR em tempo real (LOGAN et al., 2001; VAN NIEROP et al., 2005; SCHUMAN et al., 2007), multiplex PCR (WESLEY et al., 2000; KLENA et al., 2004; MILLER et al., 2007), *Restriction Fragment Length Polymorphism* PCR (TAKAHASHI et al., 2006; RAUT et al., 2007) e *Random Amplification of Polymorphic DNA* PCR (AÇIK et al., 2006).

6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A constante preocupação das indústrias alimentícias, especialmente as cárneas, em ter seus produtos livres de micro-organismos patogênicos, faz com que as empresas utilizem grandes quantidades de antibióticos em suas cadeias produtivas (AARESTRUP; WEGENER, 1999).

Porém, o que se observa é um aumento nos casos de infecções de origem alimentar causadas por micro-organismos como *Campylobacter* e *Eschericia coli* resistentes a antibióticos. Segundo Pezzotti et al. (2003), Mayrhofer et al. (2004) e Rönner et al. (2004), esta resistência a antibióticos ocorre devido ao uso massivo destes medicamentos na prevenção ou terapia de enfermidades e na promoção do crescimento de animais nos modernos sistemas intensivos de produção.

Para Rönner et al. (2004), não só a utilização destes medicamentos na produção animal, mas, também a falta de restrição com relação às prescrições médicas para tratamento humano é outro agravante. Em pesquisa realizada na Suécia, esses autores concluíram que devido ao fato desse país possuir medidas preventivas contra o uso massivo de antibióticos na produção animal, os níveis de resistência aos antibióticos por *Campylobacter* são inferiores aos registrados em outros países.

Os casos de *Campylobacter* resistentes aos antibióticos foram observados em estudos realizados em diferentes países do mundo como Itália (PEZZOTTI et al., 2003), Dinamarca (ALBAN et al., 2007), Coreia (SHIN; LEE, 2007), Suécia (RÖNNER et al., 2004), Estados Unidos (OLAH et al., 2006), Reino Unido (LITTLE et al., 2008), Áustria (MAYRHOFER et al., 2004), Austrália (MIFLIN et al., 2007), República Tcheca (BARDON et al., 2009) e Canadá (INGLIS et al., 2005 e GUÉVREMONT et al., 2006).

Apesar da eritromicina ser considerada a droga de escolha para o tratamento de enfermidades provocadas por *Campylobacter*, alguns estudos realizados em diferentes países já registraram a resistência desse micro-organismo a esse medicamento como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequência de resistência de isolados de *Campylobacter* à eritromicina oriundos de amostras humanas em diferentes países.

PAÍS	Nº AMOSTRAS	RESISTÊNCIA (%)
Canadá (<i>C. coli</i>) ^a	16	12
Canadá (<i>C. jejuni</i>) ^a	23	9
Republica Tcheca (<i>C. jejuni</i>) ^b	77	1,3
Suécia (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>) ^c	108	6
Itália (<i>C. jejuni</i>) ^d	136	1,4
Itália (<i>C. coli</i>) ^d	29	24.1

^a Guévremont et al. (2006), ^b Bardon et al. (2009), ^c Rönner et al. (2004), ^d Pezzotti et al. (2003).

Não só a resistência de cepas de *Campylobacter* à eritromicina preocupa pesquisadores em todo mundo, uma vez que a resistência a vários outros medicamentos tem sido registrada.

Pezzotti et al. (2003) observaram em pesquisa realizada no nordeste da Itália, que todas as cepas de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* encontradas em amostras obtidas de frangos, suínos, bovinos e em amostras de humanos, apresentavam algum grau de resistência a antibióticos como enrofloxacin, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidixico, cefalotina, azitromicina e sulfametoxazol associado à trimetropina, sendo a cefalotina e o sulfametoxazol associado à trimetropina os medicamentos aos quais os isolados demonstraram mais resistência.

No Reino Unido, em estudos de resistência registrados por Little et al. (2008), em 222 isolados de *Campylobacter* oriundos de carne suína, bovina e ovina crua, todos apresentaram resistência à trimetropina, seguidos de altos índices de resistência à ampicilina (40,7 a 72,2%) e à tetraciclina (14,1 a 59,4%), sendo 65,8% dos resistentes identificados como *Campylobacter jejuni* e 29,3% como *Campylobacter coli*.

Em pesquisa realizada com amostras intestinais de suínos coletadas diretamente do abatedouro na Coréia do Sul, Shin e Lee (2007) observaram que todos os isolados identificados como *Campylobacter coli* eram resistentes a pelo menos um antibiótico, sendo ciprofloxacina e eritromicina os medicamentos que apresentaram os níveis mais altos de resistência (84,2 e

83,3%, respectivamente) e dos sete medicamentos testados, 53,5% dos isolados apresentavam resistência a no mínimo três drogas diferentes.

Guévremont et al. (2006) registraram em sua pesquisa realizada no Canadá durante os anos de 1998 e 1999, uma alta contaminação por *Campylobacter coli* nas amostras oriundas de suínos e por *Campylobacter jejuni* nas amostras oriundas de aves e humanos. Destes isolados, os maiores níveis de resistência foram relacionados à tetraciclina nas três populações. Por outro lado, os testes com eritromicina e clindamicina apontaram ótimos níveis de susceptibilidade, com exceção das amostras isoladas de suínos.

Dados como esses, originários de diferentes continentes, demonstram que a resistência de *Campylobacter* a antibióticos é um problema de ordem mundial e que maior número de pesquisas para o melhor entendimento e o aprimoramento do controle da contaminação e da ocorrência de enfermidades por este micro-organismo devem ser realizadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Campylobacter* tornou-se alvo de estudos pelos órgãos relacionados à saúde pública em diferentes países de todo o mundo por apresentar crescente prevalência e resistência a antibióticos, juntamente com a dificuldade em se estabelecer parâmetros tanto para seu isolamento quanto para sua identificação, devido ao ainda limitado conhecimento sobre o comportamento e desenvolvimento deste micro-organismo.

Por estar cada vez mais relacionado com enfermidades em humanos, estudos epidemiológicos de *Campylobacter* em alimentos tornam-se de extrema importância.

Adicionalmente, devido à ocorrência de outros quadros clínicos gerados por *Campylobacter* além da campilobacteriose, pesquisas relacionadas à identificação das espécies e à resistência a antibióticos devem ser incentivadas para a garantia da saúde e segurança da população ao consumir alimentos que podem estar contaminados por esse patógeno.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microbes and Infection**. v. 1, p. 639-644, 1999.

AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 370-375, 2006.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los Alimentos**. 1. Ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 464 p.

ALBAN, L.; NIELSEN, E.O.; DAHL, J. A human health risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with the use of macrolides in danish pig production. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 83, p. 115-129, 2008.

ALLOS, B.M.; LIPPY, F.T.; CARLSEN, A.; WASHBURN, R.G.; BLASER, M.J. *Campylobacter jejuni* Strains from Patients with Guillain-Barré Syndrome. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, p. 263-268, 1998.

BARDON, J.; KOLAR, M.; CEKANOVA, L.; HEJNAR, P.E; KOUKALOVA, D. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its Resistance to Antibiotics in Poultry in the Czech Republic. **Zoonoses Public Health**. v. 56, p. 111-116, 2009.

BIOMÉRIEUX, Disponível em: <
http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_2> Acesso em 03. jan. 2010.

BLASER, M.J.; ALLOS, B.M.; LANG, D. Development of Guillain-Barré Syndrome following *Campylobacter* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 176, p. S91, 1997.

BOLAN, R.S.; DAL BÓ, C.; VARGAS, F.R.; MORETTI, G.R.F.; ALMEIDA, L.P.; ALMEIDA, G.K.; DIAS, P.V.L. Síndrome de Guillain-Barré. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**. v. 51, p. 58-61, 2007.

BOURKE, B.; CHAN, V.L.; SHERMAN, P. *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the Wings. **Clinical Microbiology**. v. 11, p. 440-449, 1998.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. **Food safety facts on *Campylobacter***. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/concen/cause/campye.shtml>> Acesso em: 28 ago. 2009.

CAPORALE, C.M.; PAPOLA, F.; FIORONI, M.A.; AURELI, A.; GIOVANNINI, A.; NOTTURNO, F.; ADORNO, D.; CAPORALE, V.; UNCINI, A. Susceptibility to Guillain-Barré syndrome is associated to polymorphisms of CD1 genes. **Journal of Neuroimmunology**. v. 177, p. 112-118, 2006.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of Veterinary Microbiology**. 5 ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1995. 394 p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO. ***Campylobacter jejuni* / campilobacteriose** Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/CAMPYLOBACTER.htm> Acesso em: 15 jun. 2009.

Diretiva 2003/99/EC da União Européia. **Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de novembro de 2003, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, que altera a Decisão 90/424/CEE do Conselho e revoga a Diretiva 92/117/CEE do Conselho**. Disponível em: <<http://eur->

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:PT:PDF
> Acesso em: 13 mar. 2008.

Diretiva 2007/516/EC da União Européia. **Decisão da Comissão de 19 de julho de 2007, relativa à participação financeira da Comunidade para a realização, nos Estados-Membros, de um estudo sobre a prevalência e a resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e sobre a prevalência de *Campylobacter* spp. e de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos.** Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/> >
Acesso em: 13 mar. 2008.

ENGVALL, E.O.; BRÄNDSTRÖM, B.; GUNNARSSON, A.; MÖRNER, T.; WAHLSTRÖM, H.; FERMÉR, C. Validation of a polymerase chain reaction/restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic *Campylobacters* isolated from domestic and wild animals. **Journal of Applied Microbiology**. v. 92, p. 47-54, 2002.

ERTAS, H.B.; ÇETINKAYA, B.; MUZ, A.; ÖNGÖR, H. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 203-209, 2004.

EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de Bacteriologie Vétérinaire**. Disponível em: <www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html> Acesso em: 20 jun. 2009.

FERNÁNDEZ, H.; RODRÍGUEZ, R.; BARUDI, C.; LOBOS, M. A case of acute diarrhea due to the emerging pathogen *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* in southern Chile. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 52-54, 2003.

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, p. 157-162, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

GHA FIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 111-120, 2007.

GHA FIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. **Journal of Food Protection**. v. 71, p. 35-45, 2008.

GODSCHALK, P.C.R.; VAN BELKUM, A.; VAN DEN BRAAK, N.; VAN NETTEN, D.; ANG, C.W.; JACOBS, B.C.; GILBERT, M.; ENDTZ, H.P. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* genes involved in lipooligosaccharide biosynthesis identifies putative molecular markers for Guillain-Barré Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 2316-2320, 2007.

GOOSSNES, H.; VLAES, L.; DEBOECK, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; LEVY, J.; DE MOL, P.; BUTZLER, J.P.; VANDAMME, P. Is "*Campylobacter upsaliensis*" an unrecognised cause of human disease? **Lancet**. v. 335, p. 584-586, 1990.

GUÉVREMONT, E.; NADEAU, É.; SIROIS, M.; QUESSY, S. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* from humans, swine, and chicken broilers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 70, p. 81-86, 2006.

GUMPEL, J.M.; MARTIN, C.; SANDERSON, P.J. Reactive arthritis associated with campylobacter enteritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 40, p. 64-65, 1981.

HAN, K.; JANG, S.S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **Food Microbiology**. v. 114, p. 50-59, 2007.

HANNU, T.; MATTILA, L.; RAUTELIN, H.; PELKONEN, P.; LAHDENNE, P.; SIITONEN, A.; LEIRISALO-REPO, M. *Campylobacter*- triggered reactive arthritis: a population-based study. **Rheumatology**. v. 41, p. 312-318, 2002.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

INGLIS G.D.; MCALLISTER, T.A.; BUSZ, H.W.; YANKE, L.J.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E.; READ, R.R. Effects of subtherapeutic administration of antimicrobial agents to beef cattle on the prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 3872-3881, 2005.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOSEFSEN, M.H.; LÜBECK, P.S.; HANSEN, F.; HOORFAR, J. Towards an international standard for PCR- based detection of foodborne thermotolerant *Campylobacters*: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. **Journal of Microbiological Methods**. v. 58, p. 39-48, 2004.

KLENA, J.D.; PARKER, C.T.; KNIBB, K.; IBBITT, J.C.; DEVANE, F.M.L.; HORN, S.T.; MILLER, W.G.; KONKEL, M.E. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5549-5557, 2004.

LABARCA, J.A.; STURGEON, J.; BORENSTEIN, L.; SALEM, N.; HARVEY, S.M.; LEHNKERING, E.; REPORTER, R.; MASCOLA L. *Campylobacter upsaliensis*: another Pathogen for Consideration in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, p. 59-60, 2002.

LASTOVICA, A.J.; LEROUX, E. Prevalence of *Campylobacter* spp. in the diarrhoeic stools and blood cultures of pediatric patients. **Acta Gastro-Enterology Belgium**. v. 56, p. 1624-1625, 2003.

LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meat in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003- 2005. **Food Microbiology**. v. 25, p. 538-543, 2008.

LINDBLOM, G.B.; SJOGREN, E.; HANSSON-WESTERBERG, J.; KAIJSER, B. *Campylobacter upsaliensis*, *C. sputorum sputorum* and *C. concisus* as common causes of diarrhea in children. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**. v. 27, p. 187-188, 1995.

LOGAN, J.M.J.; EDWARDS, K.J.; SAUNDERS, N.A.; STANLEY, J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time pcr. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 2227-2232, 2001.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.M.; HILBERT F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 23-29, 2004.

MERCK, Disponível em: < http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en_US/-/ViewProductDetail-Start?ProductUUID=vUCb.s1OTH0AAAEWvQUW4z8h&PórtalCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTI> Acesso em 15. jan. 2009.

MEDICINA GERIÁTRICA, Disponível em: <
<http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/09/07/saude-geriatria/artrite-reativa/>
 > Acesso em: 24. mar. 2009.

MIFLIN, J.K.; TEMPLETON, J.M.; BLACKALL, P.J. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 775-778, 2007.

MILLER, W.G.; PARKER, C.T.; HEATH, S.; LASTOVICA, A.J. Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the *nap* locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. **BMC Microbiology**. v. 7, p. 1-8, 2007.

MODOLO, J.R.; MARGATO, L.F.F.; GOTTSCHALK, A.F.; LOPES, C.A. DE M. Incidence of *Campylobacter* in pigs with and without diarrhea. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 19-21, 1999.

MURRAY, P. **Manual of clinical microbiology**. 6. Ed. Washington : AMS Press, 1995. 2256 p.

NICHOLAS, F.W. **Introdução a genética veterinária**. 1. Ed. Porto Alegre : Artmed, 1999.

OLAH, P.A.; DOETKOTTB, C.; FAKHRA, M.K.; LOGUEA, C.M. Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. Isolated from freshly processed Turkeys. **Food Microbiology**. v. 23, p. 453-460, 2006.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. 1. Ed. Criciúma: do autor, 2006. 680 p.

OLIVO, N. **Cores e sabores de São Paulo**. 1. Ed. Criciúma: do autor, 2007. 204 p.

ONO, K.; YAMAMOTO, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitana, Japan. **International Journal of Food Microbiology**. v. 1, p. 211-219, 1999.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals ad meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 82, p. 281-287, 2003.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RAUT, A.D.; KAPADNIS, B.P. Nonspecific PCR Amplification of the 16s rrna gene segment in different bacteria by use of primers specific for *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 1376-1377, 2007.

RÖNNER, A.; ENGVALL, E.O.; ANDERSSON, L.; KAIJSER, B. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96, p. 173-179, 2004.

SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; LANTERO, M.; GASTANARES, M.J.; BAQUERO, J.; TORRES, C. Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals, Foods, and Humans in Spain in 1997–1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 267-271, 2000.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; HARAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; FERNANDES, F.M.C.; CAMPOS, F.R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M.E.; RICHTZENHAIN, L.R. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp.

Jejuni strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 378-382, 2005.

SANDSTEDT, K.; URSING, J.; WALDER, M. Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. **Current Microbiology**. v. 8, p. 209-213, 1983.

SCHUMAN, T.; BOER, R.F.; VAN ZANTEN, E.; VAN SLOCHTEREN, K.R.; SCHEPER, H.R.; DIJK-ALBERTS, B.G.; MÖLLER, A.V.M.; KOOISTRA-SMID, A.M.D. Feasibility of a Molecular Screening Method for Detection of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in a Routine Community-Based Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 3692-3700, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 536 p.

SHIN, E.; LEE, Y. Antimicrobial resistance of 114 porcine isolates of *Campylobacter coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 118, p. 223-227, 2007.

SINHA, S.; PRASAD, K.N.; PRADHAN, S.; JAIN, D.; JHA, S. Detection of preceding *Campylobacter jejuni* infection by polymerase chain reaction in patients with Guillain-Barré syndrome. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, p. 342-346, 2004.

SMITH, J.L. Review: *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, guillain-barré syndrome, and reactive arthritis. **Journal of food protection**. v. 65, p. 696-708, 2002.

STEELE, T.W.; SANGSTER, N.; LANSER, J.A. DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. Isolated in Central and South Australia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p. 71-74, 1988.

TAKAHASHI, R.; SHAHADA, F.; CHUMA, T.; OKAMOTO, K. Analysis of *Campylobacter* spp. contamination in broilers from the farm to the final meat cuts by using restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 110, p. 240-245, 2006.

TAM, C.C.; RODRIGUES, L.C.; O'BRIEN, S.J. Guillain-Barré Syndrome associated with *Campylobacter jejuni* Infection in England, 2000-2001. **Clinical Infectious Diseases**. v. 37, p. 307-310, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 720 p.

VAN DE PUTTE, L.B.; BERDEN, J.H.; BOERBOOMS, M.T.; MULLER, W.H.; RASKER, J.J.; REYNVAAN-GROENDIJK, A.; VAN DER LINDEN, S.M. Reactive arthritis after *Campylobacter jejuni* enteritis. **Journal of Rheumatology**. v. 7, p. 531-535, 1980.

VAN NIEROP, W.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIRTER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J.S.; BLOOMFIELD, S.F. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 99, p. 1-6, 2005.

WESLEY, I.V.; WELLS, S.J.; HARMON, K.M.; GREEN, A.; SCHROEDER-TUCKER, L.; GLOVER, M.; SIDDIQUE, D.I. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 1994-2000, 2000.

WHO, World Health Organization, Disponível em: <
<http://www.who.int/topics/campylobacter/en/> > Acesso em: 25. Fev. 2009.

WINN, W.C.; KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. 1565 p.

WORKMAN, S.N.; MATHISON, G.E.; LAVOIE, M.C. An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 106-111, 2008.

CAPÍTULO 2

PREVALÊNCIA DE *Campylobacter* sp. TERMOFÍLICO NA LINHA DE ABATE DE SUÍNOS EM ABATEDOURO NO SUL DO BRASIL

*(Prevalence of thermophilic Campylobacter sp. during pig
slaughtering in a slaughterhouse in south of Brazil)*

PREVALÊNCIA DE *Campylobacter* sp. TERMOFÍLICO NA LINHA DE ABATE DE SUÍNOS EM ABATEDOURO NO SUL DO BRASIL

(Prevalence of thermophilic Campylobacter sp. during pig slaughtering in a slaughterhouse in south of Brazil)

¹ Raquel Szygalski Biasi; ² Renata Ernlund Freitas de Macedo, ³ Paulo Rogério Franchin

¹ Médica Veterinária, Mestranda do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, quel_biasi@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, Professora do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, renata.macedo@pucpr.br

³ Farmacêutico Bioquímico, Doutor em Ciência dos Alimentos - paulofranchin@brturbo.com.br

RESUMO - Apesar do gênero *Campylobacter* estar relacionado à maioria das infecções alimentares, pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção, do momento da contaminação durante a cadeia produtiva dos alimentos e da contribuição dos animais de produção em sua ocorrência. Estudos para a detecção de *Campylobacter* em amostras oriundas de aves vêm sendo desenvolvidos há algum tempo, porém no campo da suinocultura pouco se sabe sobre os níveis de contaminação por este patógeno. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de *Campylobacter* sp. na linha de abate de suínos pela utilização de métodos de determinação quantitativo e qualitativo. Do total de 259 amostras coletadas em sete diferentes etapas do abate de suínos, verificou-se isolamento de *Campylobacter* sp. em apenas 9 amostras (3,5%). Dessas amostras positivas, 5 (55,6%) foram isoladas nas etapas de escalda e depilação mecânica das carcaças, demonstrando que estas são etapas críticas do abate de suínos para a contaminação por *Campylobacter*, provavelmente devido à baixa frequência de renovação da água do tanque de escalda e/ou má higienização dos dedos de borracha da depiladora. Também foi verificada a ocorrência de contaminação por *Campylobacter* em uma das amostras coletadas após a refrigeração das carcaças. A ocorrência de *Campylobacter* mostrou-se relacionada principalmente à contaminação cruzada durante algumas etapas do abate, contudo, apesar do baixo número de células viáveis de *Campylobacter* e da baixa frequência de isolamento nas amostras avaliadas, o risco de contaminação por *Campylobacter* pelo consumo de carne suína não deve ser desprezado, visto tratar-se de patógeno humano emergente.

Palavras-chave: *Campylobacter*, prevalência, contagem.

ABSTRACT - Although *Campylobacter* is related to the majority of the foodborne diseases, little is known about the epidemiology of infection, the moment of contamination during pork production chain and the contribution of pig on its occurrence. Of 259 samples collected in seven different points of pig slaughter, *Campylobacter* was found in 9 samples (3.5%). Of the positive samples, 5 (55.6%) were collected in the second step of slaughter process, after carcass scalding and dehairing, demonstrating that the scalding and dehairing were critical steps in pig slaughtering for *Campylobacter* contamination. *Campylobacter* was also found in one sample collected after carcass chilling. The occurrence of *Campylobacter* was related mainly to cross-contamination during slaughter steps. Despite the low number of viable cells of *Campylobacter* sp. and the low frequency of isolation in the samples, the risk of *Campylobacter* contamination in the consumption of pork should not be neglected since this is an emergent human pathogen.

Keywords: *Campylobacter*, prevalence, viable count.

1 INTRODUÇÃO

A produção nacional de carne suína vem crescendo a cada ano devido à expansão interna e externa do mercado consumidor. Sob o ponto de vista tecnológico, a produção de carne suína é uma das atividades agropecuárias que passaram pelas maiores evoluções tanto no sistema de produção quanto na garantia da qualidade da carne em si (OLIVO, 2007).

Dados da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIEPS, 2010) mostram que em 2006 houve um aumento de 6% na produção nacional de carne suína e para o ano de 2010 espera-se um aumento de 3% no volume a ser exportado.

Apesar do gênero *Campylobacter* estar relacionado à maioria das infecções alimentares, pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção e do momento da contaminação durante a cadeia produtiva dos alimentos (ONO; YAMAMOTO, 1999).

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*. É composto por bactérias pequenas (0,2 a 0,5 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento) em forma de bastonetes curvos ou espiralados e Gram negativos. Em culturas jovens é possível observar a morfologia de asa de gaivota apresentada pelos bastonetes quando observados em microscopia. Os flagelos que podem medir até três vezes o comprimento da célula são responsáveis pelo movimento característico de saca-rolha (TRABULSI et al., 1999; HIRSH; ZEE, 2003; QUINN et al., 2005; HUMPHREY et al., 2007).

Tendo em vista que os suínos são considerados reservatórios potenciais de *Campylobacter*, a carne suína pode atuar como grande veiculador desse patógeno aos humanos (ALBAN et al., 2008).

No sentido de controlar a incidência de *Campylobacter* no mercado europeu foi publicada em 2003 a Diretiva Europeia 99 que estabeleceu o monitoramento de zoonoses e agentes zoonóticos pelos Estados Membros da Comunidade Europeia em todos os estágios de produção dos alimentos e incluiu o *Campylobacter* entre esses agentes. No ano de 2007, a preocupação com contaminações por *Campylobacter* levou a União Europeia, mediante a Diretiva 516, a conceder apoio financeiro aos Estados Membros para o desenvolvimento de pesquisas de detecção, confirmação, contagem e

suscetibilidade a antibióticos de *Campylobacter* nas granjas e na linha de abate de frango.

A relevância atual do gênero *Campylobacter* como agente etiológico das infecções de origem alimentar e a necessidade de maior conhecimento relacionado à incidência deste patógeno em carne suína no Brasil tornam o estudo de sua prevalência, dos locais de ocorrência da contaminação na cadeia produtiva e das espécies associadas a essa contaminação de grande importância para o setor de carne suína e para a saúde pública.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a investigação da prevalência de *Campylobacter* termofílico na linha industrial de produção de carne suína, desde o abate dos animais até o início do processo de espostejamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para o presente estudo foram coletadas 259 amostras de carcaças suínas em um abatedouro de suínos com Serviço de Inspeção Federal localizado no Estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas de 37 carcaças suínas em 07 diferentes etapas da linha de abate durante o período de janeiro a julho de 2009.

O processo de abate de suínos é composto por diversas etapas que têm como objetivo a redução no nível de patógenos presentes no início da operação, garantindo assim um produto de qualidade para o consumidor. As principais etapas da linha industrial de abate de suínos são insensibilização, sangria, escaldagem (62°C a 72°C por 2 a 5 minutos), depilação, chameusamento, toalete, evisceração, divisão longitudinal da carcaça, classificação e refrigeração (7°C).

Na linha de abate de suínos, a coleta de amostras foi realizada nas seguintes etapas (Figura 1):

- a) após a insensibilização e corte para sangria dos animais;
- b) após a depilação mecânica das carcaças;
- c) após o chameusamento das carcaças,

- d) após a evisceração das carcaças;
- e) após a lavagem das carcaças;
- f) após o resfriamento das carcaças;
- g) após o corte do quarto traseiro da carcaça (início do espostejamento)

A escolha dos pontos de coleta de amostras entre as diferentes etapas do abate de suínos baseou-se na definição desses pontos como críticos para o controle de contaminantes microbianos no abate de suínos no local avaliado. A coleta das amostras ao longo da linha de abate objetivou a avaliação da capacidade de controle de *Campylobacter* em cada etapa do processo no frigorífico estudado.

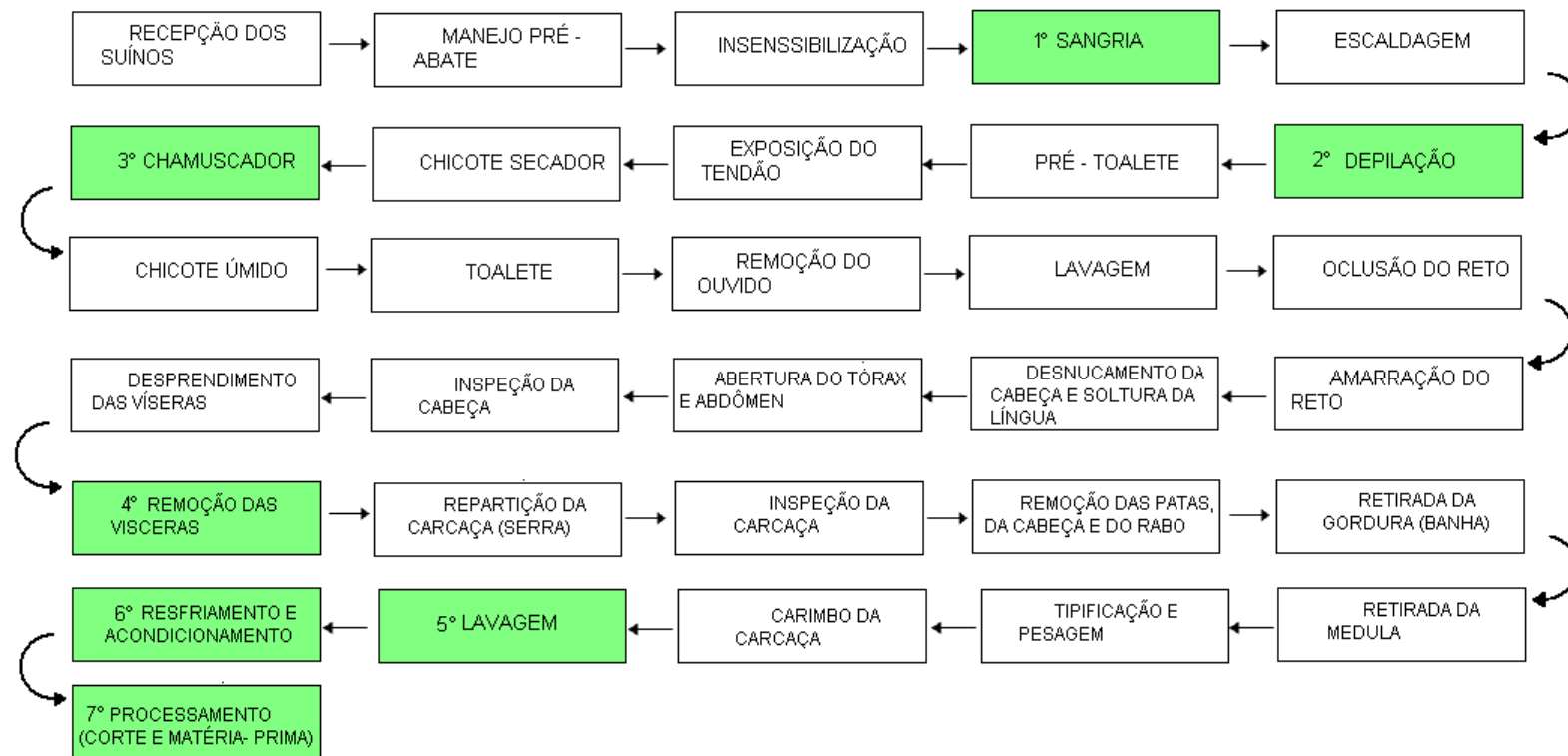


Figura 1 – Etapas selecionadas para coleta de amostras no processo de abate de suínos (etapas identificadas pela cor verde).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Procedimento de coleta de amostras

As amostras foram coletadas utilizando-se um delimitador de superfície de 100 cm², esterilizável por flambagem em álcool comercial 96°GL, mediante esfregaço com *swab* (tipo esponja). De cada carcaça foi amostrada uma área de 400 cm² compreendida pelas regiões do lombo, pernil, papada e paleta (Figura 2) (1 *swab*/ 400 cm²). Imediatamente após a coleta das amostras, os *swabs* foram acondicionados em sacos plásticos (Allzip) contendo água peptonada tamponada 0,1% no volume de 400 mL. Toda metodologia de coleta seguiu as recomendações da Diretiva 2001/471/CE da União Européia para coleta de amostras para microbiologia em carcaças suínas.

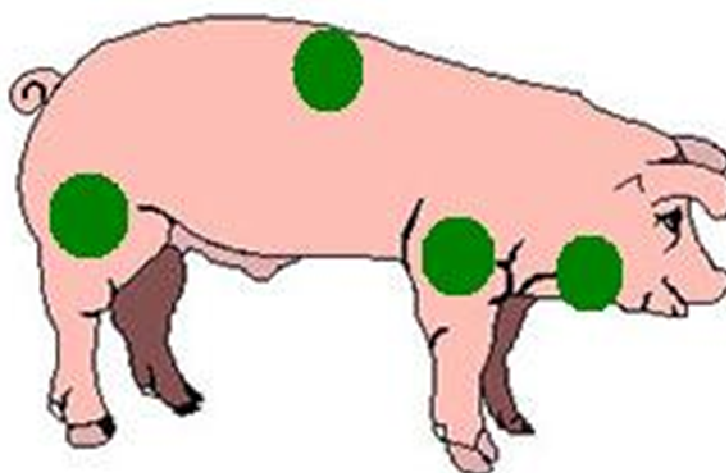


Figura 2 – Regiões da carcaça suína (em verde) utilizadas para a coleta de amostras.

2.2.2 Análise quantitativa de *Campylobacter* termofílico

O número de células de *Campylobacter* termofílico foi determinado utilizando placas de ágar Bolton modificado (ABM) (FRANCHIN et al., 2005). As placas foram inoculadas com 0,4 mL da amostra diluída em água peptonada 0,1% com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas a 42± 0,5°C por 24 a 48 horas sob atmosfera microaerófila (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N).

As colônias típicas crescidas no ágar Bolton modificado que apresentavam coloração marrom e brilho metalizado dourado, de forma arredondada, pequenas e com bordas bem definidas (Figura 3), foram selecionadas para a realização de testes de motilidade, morfologia (ao microscópico de contraste de fase), oxidase e catalase, segundo recomendação da ISO 10272-2:2006 (E) (Diretiva 2007/516/EC da União Européia).

As colônias que apresentaram crescimento típico, morfologia característica de formato de asa de gaivota ao microscópio, motilidade com movimentos em saca rolhas e oxidase positiva foram consideradas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. A partir da confirmação das colônias típicas, procedeu-se a contagem e a expressão dos resultados em UFC/ cm².



Figura 3 - Colônias características de *Campylobacter* sp. cultivadas em ágar Bolton modificado.

2.2.3 Análise qualitativa de *Campylobacter* sp. termofílico

Para verificar a presença de *Campylobacter* sp. nas amostras, a partir das amostras coletadas por swab e diluídas em água peptonada tamponada

0,1% no volume de 400 mL, procedeu-se pré-enriquecimento pela transferência de 2 mL das amostras diluídas para caldo Bolton acrescido de suplemento seletivo SR 208E (Oxoid), os quais foram incubados inicialmente a $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, seguida de nova incubação a $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 44 horas, ambas em atmosfera modificada (FRANCHIN et al., 2005).

Após a incubação, com o auxílio de alça de platina, transferiu-se uma alçada da cultura de pré enriquecimento para placas de ABM e incubou-se a $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 20 a 44 horas sob atmosfera microaerófila. Após a incubação, procedeu-se a seleção de colônias típicas de acordo com as características macroscópicas e microscópicas descritas anteriormente para confirmação do resultado, que foi expresso como presença ou ausência de *Campylobacter* sp.

O uso de ambos os métodos, quantitativo e qualitativo, para a determinação de *Campylobacter* nas amostras avaliadas deveu-se à grande sensibilidade do micro-organismo às condições de cultivo em laboratório, o que torna difícil seu isolamento e contagem. Neste sentido, o emprego de pré-enriquecimento e de isolamento direto em ágar permitem recuperar células injuriadas e inibir micro-organismos competidores, possibilitando determinar a contaminação das amostras com maior fidelidade.

As metodologias utilizadas para a determinação quantitativa e qualitativa de *Campylobacter* sp. estão apresentadas na Figura 4.

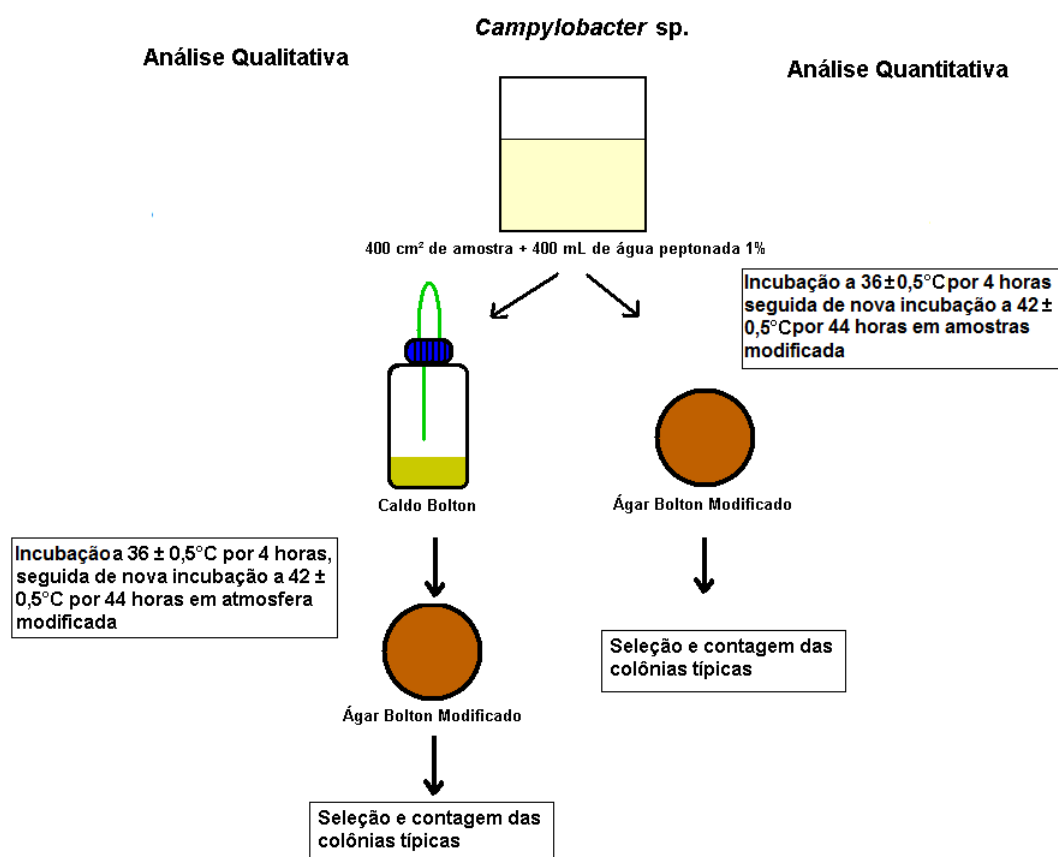


Figura 4 – Metodologias utilizadas para a determinação quantitativa e qualitativa de *Campylobacter* sp.

3 RESULTADOS

Das 37 carcaças avaliadas, 5 (13,5%) apresentaram contaminação por bactérias do gênero *Campylobacter* ou similar em uma das etapas de coleta na linha de abate e 2 carcaças (5,4%) apresentaram contaminação em mais de uma etapa de coleta.

Em relação ao número total de amostras contaminadas, das 259 amostras, somente 9 (3,5%) apresentaram crescimento bacteriano nos meios específicos para *Campylobacter* sp. (Tabela 1), sendo provenientes de 7 carcaças (18,9%) das 37 analisadas.

Tabela 1 – Prevalência de *Campylobacter* sp. em um total de 259 amostras coletadas em diferentes pontos da linha de abate de suínos.

Etapa de coleta de amostra	Nº isolados	Frequência (%)
Pós insensibilização	2	0,8%
Pós depilação	5	1,9%
Pós chameusamento	1	0,4%
Pós evisceração	0	0%
Pós lavagem das carcaças	0	0%
Pós refrigeração	1	0,4%
Pós corte do quarto traseiro	0	0%
Total de amostras positivas para <i>Campylobacter</i> sp.	9	3,5%

O 2º ponto de coleta de amostras, após a depilação mecânica das carcaças, mostrou ser a etapa de abate que apresentou a maior frequência de contaminação. Das 9 amostras contaminadas por *Campylobacter* sp. ou gênero similar, 5 (55,6%) foram isoladas nessa etapa de abate. Das demais amostras contaminadas, 2 foram obtidas no 1º ponto de coleta (22,2%), após insensibilização e sangria, uma no 3º ponto de coleta (11,1%), após chameusamento e uma no 6º ponto de coleta (11,1%) após resfriamento (Figura 5).

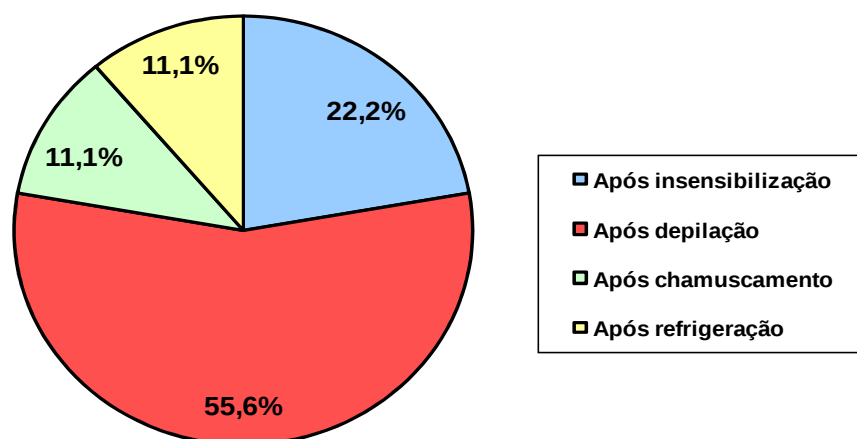


Figura 5 – Frequência de contaminação por *Campylobacter* sp. em diferentes pontos de coleta da linha de abate de suínos.

Dos 9 isolados, 7 foram detectados pelo método qualitativo e 2 pelo método quantitativo. Os dois isolados detectados pelo método quantitativo foram obtidos de etapas diferentes da linha de abate, um isolado foi proveniente do 2º ponto (pós depilação) e apresentou contagem de 2,5 UFC/cm² e o outro isolado, originário do 6º ponto (pós refrigeração), mostrou valor de 150 UFC/cm². Todas as demais amostras submetidas à contagem de *Campylobacter* sp. (determinação quantitativa) mostraram contagens inferiores a 2,5 UFC/cm² de células viáveis.

4 DISCUSSÃO

A prevalência de *Campylobacter* sp. em amostras suínas coletadas em abatedouros e no varejo geralmente é baixa, especialmente quando comparada a amostras coletadas de aves, peru e de carne ovina e aponta resultados semelhantes em amostras originárias de bovinos (INGLIS et al., 2005; MAYHOFER et al. 2005).

Ghafir et al. (2007) verificaram a ocorrência de *Campylobacter* sp. em 71,9% das carcaças de frango e em 3,3% das carcaças bovinas pesquisadas. Entretanto, o nível de prevalência observado por Ono et al. (1999) compreendeu 27,9% das carcaças de frango e não houve registro nas amostras bovinas.

Oyarzabal et al. (2007), Takahashi et al. (2006) e Mayrhofer et al. (2004) verificaram alta frequência de contaminação por *Campylobacter* sp. (65%, 50% e 51%, respectivamente) em carne de frango. Mayrhofer et al. (2004) também observaram elevados índices de prevalência de *Campylobacter* sp. em amostras de peru (53%).

Variações na prevalência também podem ser observadas em amostras obtidas de carcaças ovinas como verificado por Aşik et al. (2006) que registraram ocorrência em 63,8% das carcaças, enquanto Zweifel et al. (2004) relataram apenas 17,5% de contaminação pelo gênero *Campylobacter*.

No presente trabalho verificou-se prevalência de 3,5% de *Campylobacter* sp. em 259 amostras suínas coletadas. Little et al. (2008) e Mayrhofer et al. (2004) encontraram níveis de contaminação próximos, 5% e 2,4%

respectivamente, enquanto Ono et al. (1999) não registraram contaminação por este micro-organismo em amostras suínas coletadas em abatedouro.

Das 37 carcaças suínas avaliadas no presente estudo, observou-se contaminação por *Campylobacter* sp. em 7 carcaças (18,9%). Ghafir et al. (2008) verificaram contaminação de carcaças suínas por *Campylobacter* sp. semelhante à encontrada no presente trabalho, com porcentual de 17% no período entre 1997 a 1999 em estudo realizado na Bélgica.

Assim como nas outras espécies animais, os níveis de contaminação por *Campylobacter* sp. na espécie suína mostram grande variação conforme a localidade pesquisada. Na Itália, Pezzotti et al. (2003) detectaram 63,5% das amostras de suínos contaminadas por *Campylobacter* sp. Humphrey et al. (2007) analisaram dados de 21 diferentes países e verificaram baixos valores de prevalência (5,1%). Valores semelhantes de prevalência em carne suína foram registrados por Whyte et al. (2004) na Irlanda, por Mayrhofer et al. (2004) na Áustria e por Little et al. (2008) no Reino Unido.

Porém, em amostras de vísceras de suínos (fígado, coração, rins e intestinos), Little et al. (2008) observaram contaminação por micro-organismos do gênero *Campylobacter* quase quatro vezes superior (18,3%) à encontrada na carne dos mesmos animais.

Nesbakken et al. (2003) relataram frequência de contaminação ainda maior, associada aos intestinos (100%) e às tonsilas (66,7%) em amostras coletadas em abatedouro de suínos na Noruega. Na França, Payot et al. (2004) confirmaram que de 240 amostras estomacais coletadas no abate dos suínos, metade apresentou-se contaminada por *Campylobacter* sp..

A linha de processamento de suínos é considerada um sistema com diversas oportunidades para a ocorrência da contaminação da carcaça por bactérias patogênicas, não contendo nenhuma etapa que possa ser considerada completamente livre de perigo, podendo a contaminação ser controlada apenas pela aplicação de procedimentos seguros de abate (BORCH et al., 1996).

Neste estudo, do total de isolados de *Campylobacter*, 55,6% foram isolados após depilação, 22,2% após insensibilização e sangria, 11,1% após chameusamento e 11,1% após resfriamento. Esses resultados indicaram que a contaminação por *Campylobacter* ficou restrita a algumas etapas do abate de

suínos, não sendo detectada após a evisceração, lavagem e corte do quarto traseiro, que consistiu na etapa final do processamento das carcaças.

A contaminação observada após a sangria pode ter sido originária de contaminações cruzadas, a partir de cepas habitantes do trato intestinal do suíno abatido ou de outros suínos, uma vez que diferentes graus de contaminação por *Campylobacter* foram registrados nas fezes desses animais por vários pesquisadores. Além disso, no momento da realização do corte para a sangria, a faca mal higienizada também pode servir como carreador de micro-organismos patogênicos entre as carcaças, ou o sangue liberado pode escorrer pela superfície do animal e entrar em contato com micro-organismos oriundos de procedimentos anteriores (PARDI et al., 2006).

Ono et al. (1999) observaram que a contaminação por *Campylobacter* atingiu 95,1% das amostras de fezes suínas analisadas. Adesiyun e Krishnan (1995) obtiveram valores de 54% de prevalência de *Campylobacter* sp. nas amostras obtidas em Trindade. Campos (2006) observou a presença do gênero *Campylobacter* em 26,6% das amostras (120 amostras) de fezes obtidas diretamente da ampola retal de suínos em 4 abatedouros do estado de São Paulo. Entretanto, Modolo et al. (1999) relataram contaminação de 77% de *Campylobacter* em fezes de suínos no Brasil.

A depilação mecânica das carcaças, que compreendeu ao 2º ponto de coleta de amostras, apresentou a maior frequência de contaminação (55,6%) entre as etapas de abate de suínos avaliadas.

Previamente à depilação mecânica, as carcaças suínas são submetidas à escalda, que promove o afrouxamento dos folículos pilosos facilitando a retirada das cerdas da pele na depilação. A alta frequência de contaminação observada após a execução desses procedimentos pode ser ocasionada pela baixa renovação da água do tanque de escalda ou pelo controle deficiente da sua temperatura. No Brasil, a escalda das carcaças suínas deve ser realizada com água a temperatura entre 62 a 72°C pelo tempo de 2 a 5 minutos, sendo mantida a integridade da pele. Além disso, exige-se o esvaziamento sistemático do tanque de escalda e sua higienização (BRASIL, 1995).

Outro fator importante para a ocorrência de contaminação por *Campylobacter* nas carcaças após a depilação está relacionado ao tipo de material utilizado nos dedos da depiladora, os quais por serem de borracha,

não podem ser removidos para a limpeza e desinfecção, facilitando o acúmulo de resíduos propiciando o desenvolvimento de micro-organismos.

Nesta pesquisa, apenas uma amostra apresentou contaminação no 6º ponto de coleta correspondente à refrigeração das carcaças e uma amostra no 3º ponto de coleta, após o chamuscamento.

Campos (2006) também avaliou a ocorrência de *Campylobacter* em esfregaços de carcaças suínas após a refrigeração e verificou que todas as amostras foram negativas para esse gênero de micro-organismo. Esses resultados indicaram que apesar da elevada frequência de isolamento de *Campylobacter* nas fezes suínas, esses micro-organismos não foram encontrados após a refrigeração das carcaças, sugerindo que o processo de industrialização de suínos durante as etapas de abate reduziram o número inicial de células viáveis de *Campylobacter* encontradas nas fezes.

Em pesquisa com carcaças de frango no Japão, Ono e Yamamoto (1999) também não registraram a ocorrência de *Campylobacter* após a refrigeração em avaliações realizadas em 1994, 1995 e 1996.

Gebreyes et al. (2005) notaram, em seu estudo, que entre os isolados de *Campylobacter* obtidos ao longo da linha de abate de aves, 2,3% deles eram originários da coleta após a refrigeração das carcaças.

Gill e Bryant (1993) em pesquisa realizada em duas plantas de processamento de suínos registraram contagens de 30 a 70 UFC/ cm² em amostras coletadas após a depilação e de 1 a 6 UFC/ cm² nas amostras obtidas após o chamuscamento e toalete das carcaças. Baixa contaminação por *Campylobacter* também foi verificada no presente estudo, para o qual foram observados valores inferiores a 2,5 UFC/ cm² em 99,2% das amostras analisadas. Somente 2 amostras mostraram contagem superior, com valores de 2,5 UFC/ cm² em amostra coletada após a depilação e 150 UFC/ cm² em amostra coletada após a refrigeração.

Ghafir et al. (2008) encontraram contagens variando de <1 UFC/ 600cm² a >249 UFC/ 600cm² em amostras de carcaças suínas coletadas logo após o abate.

Devido à classificação de *Campylobacter* como um patógeno humano emergente e dos estudos epidemiológicos serem recentes, ainda não foram estabelecidos padrões legais, tanto no Brasil como em outros países, para a

presença de *Campylobacter* nos alimentos. Contudo, por se tratar de um patógeno de grande impacto na saúde pública e no comércio de alimentos, é provável que o padrão microbiológico para *Campylobacter* em carnes seja definido em semelhança ao de patógenos como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, para os quais exige-se a ausência em 25g de amostra, visto que segundo Adams e Moss (1997) e Silva et al. (2007), a dose infectiva é baixa, estimando-se que a ingestão de 400 a 500 células possa provocar a doença.

Considera-se fonte de contaminação de *Campylobacter* para o ser humano, o contato direto com animais portadores, o consumo de água e alimentos de origem animal contaminados, geralmente a ingestão de carnes cruas ou mal passadas de aves, suínos e bovinos e de leite não pasteurizado. Neste sentido, apesar da baixa frequência e contagem de *Campylobacter* nas amostras estudadas não se pode descartar ou desprezar o risco de contaminação por *Campylobacter* pelo consumo de carne suína.

5 CONCLUSÃO

A frequência de isolamento de *Campylobacter* nas amostras obtidas de carcaças suínas no frigorífico avaliado foi baixa (3,5%), ficando restrita a algumas etapas do abate como a insensibilização, depilação, chamuscamento e refrigeração, não sendo detectada na etapa final do processamento das carcaças (corte do quarto traseiro).

A etapa da linha do abate que apresentou a maior frequência de contaminação por *Campylobacter* foi a depilação mecânica das carcaças, provavelmente devido à deficiências de higienização do equipamento, promovendo contaminações cruzadas.

Pela análise quantitativa, somente duas amostras mostraram contagem de *Campylobacter* superior a 2,5 UFC/ cm², com valores que variaram de 2,5 a 150 UFC/ cm².

Apesar do baixo número de células viáveis de *Campylobacter* e da baixa frequência de isolamento nas amostras avaliadas, o risco de contaminação por *Campylobacter* pelo consumo de carne suína não deve ser desprezado, visto tratar-se de patógeno humano emergente.

REFERÊNCIAS

AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 370-375, 2006.

ABIEPCS. Associação Brasileira das Indústrias Produtoras e Exportadoras de Carne Suína, **Carne Suína Brasileira em 2006**. Disponível em: <<http://www.abiepcs.org.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los Alimentos**. 1. Ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 464 p.

ADESIYUN, A.A.; KRISHNAN, C. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* 0:3, *Listeria monocytogenes* 0:4 and thermophilic *Campylobacter* spp. In slaughter pigs and carcasses in Trinidad. **Food Microbiology**. v. 12, p. 99-107, 1995.

ALBAN, L.; NIELSEN, E.O.; DAHL, J. A human health risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with the use of macrolides in danish pig production. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 83, p. 115-129, 2008.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 30, p. 9-25, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 711 de 01 de novembro de 1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 03 de novembro de 1995, Seção 1, p.17625.

CAMPOS, F.R. Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo. 2006. 49 p. Dissertação (Pós- graduação em

epidemiologia experimental e aplicada as zoonoses) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Diretiva 2003/99/EC da União Européia. **Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de novembro de 2003, relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, que altera a Decisão 90/424/CEE do Conselho e revoga a Diretiva 92/117/CEE do Conselho.** Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:PT:PDF>> Acesso em: 13 mar. 2008.

Diretiva 2001/471/EC da União Européia. **Decisão da Comissão de 18 de junho de 2001 que estabelece regras para os controles de higiene geral efetuados pelos operadores aos estabelecimentos de acordo com a Diretiva 64/433/CEE relativa às condições de produção e de colocação de carnes frescas no mercado e com a Diretiva 71/118/CEE relativa a problemas sanitários em matéria de comércio de carnes frescas de aves de poedeira.** Disponível em: < <http://eurlex.europa.eu//> > Acesso em: 13 mar. 2008.

Diretiva 2007/516/EC da União Européia. **Decisão da Comissão de 19 de julho de 2007, relativa à participação financeira da Comunidade para a realização, nos Estados-Membros, de um estudo sobre a prevalência e a resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e sobre a prevalência de *Campylobacter* spp. e de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos.** Disponível em: <http://eurlex.europa.eu//> > Acesso em: 13 mar. 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, p. 157-162, 2005.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; MORROW, W. E. M. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine

production systems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 56, p. 765-768, 2005.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; de ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology.** v. 116, p. 111-120, 2007.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. **Journal of Food Protection.** v. 71, p. 35-45, 2008.

GILL, C.O.; BRYANT, J. The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. **Food Microbiology.** v. 10, p. 337-344, 1993.

HIRSH, D.C; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

HUMPHREY, T., O'BRIEN, S; MADSEN, M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology.** v. 117, p. 237-257, 2007.

INGLIS, G.D.; MCALLISTER, T.A.; BUSZ, H.W.; YANKE, L.J.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E.; READ, R.R. Effects of Subtherapeutic Administration of Antimicrobial Agents to Beef Cattle on the Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. **Applied And Environmental Microbiology.** v. 71, p. 3872-3881, 2005.

LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meat in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003- 2005. **Food Microbiology.** v. 25, p. 538-542, 2008.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.M.; HILBERT F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 23-29, 2004.

MODOLO, J.R.; MARGATO, L.F.F.; GOTTSCHALK, A.F.; LOPES, C.A. DE M. Incidence of *Campylobacter* in pigs with and without diarrhea. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 19-21, 1999.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HØIDAL, H. K.; RØTTERUD, O. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**. v. 80, p. 231-240, 2003.

OLIVO, N. **Cores e sabores de São Paulo**. 1. Ed. Criciúma: do autor, 2007. 204 p.

ONO, K.; YAMAMOTO, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitana, Japan. **International Journal of Food Microbiology**. v. 1, p. 211-219, 1999.

OYARZABAL, O.A.; BACKERT, S.; NAGARAJ, M.; MILLER R.S.; HUSSAIN, S.K.; OYARZABAL, E.A. Efficacy of supplemented buffered peptone water for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from broiler retail products. **Journal of Microbiological Methods**. v. 69, p. 129-132, 2007.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. v. 1. Goiânia: UFG, 2006. p. 542.

PAYOT, S.; DRIDI, S.; LAROCHE, M.; FEDERIGHI, M.; MAGRAS, C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. **Veterinary Microbiology**. v. 101, p. 91-99, 2004.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and

Campylobacter coli in animals ad meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 82, p. 281-287, 2003.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 536 p.

TAKAHASHI, R.; SHAHADA, F.; CHUMA T.; OKAMOTO K. Analysis of *Campylobacter* spp. contamination in broilers from the farm to the final meat cuts by using restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 110, p. 240-245, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 720 p.

ZWEIFEL, C.; ZYCHOWSKA, M.A.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, p. 45-53, 2004.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COWLEY, D.; MADDEN, R.H.; MORAN, L.; SCATES, P.; CARROLL, C.; O'LEARY, A.; FANNING, S.; COLLINS, J.D.; MCNAMARA, E.; MOORE, J.E.; CORMICAN, M. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**. v. 95, p. 111-118, 2004.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter* sp. TERMOFÍLICO ISOLADO DURANTE O ABATE DE SUÍNOS

*(Identification and antimicrobial resistance of thermophilic
Campylobacter sp. isolated in pigs during the slaughter process)*

IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter* sp.
TERMOFÍLICO ISOLADO DURANTE O ABATE DE SUÍNOS

(*Identification and antimicrobial resistance of thermophilic Campylobacter sp.
isolated in pigs during the slaughter process*)

¹ Raquel Szygalski Biasi; ² Renata Ernlund Freitas de Macedo, ³ Paulo Rogério Franchin

¹ Médica Veterinária, Mestranda do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, quel_biasi@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, Professora do Curso de Mestrado em Ciência Animal - PUCPR, renata.macedo@pucpr.br

³ Farmacêutico Bioquímico, Doutor em Ciência dos Alimentos - paulofranchin@brturbo.com.br

RESUMO- O gênero *Campylobacter* é um relevante agente etiológico de infecções de origem alimentar e tem chamado a atenção devido à resistência antimicrobiana. Essa resistência pode estar relacionada ao uso de antibióticos nos animais de produção, como preventivo de enfermidades ou como promotores de crescimento. Devido à importância atual de *Campylobacter* para a saúde pública, o presente trabalho teve como objetivo identificar as cepas de *Campylobacter* isoladas de suínos durante o abate e verificar a resistência dessas cepas a antibióticos usualmente empregados no tratamento humano. De um total de 259 amostras coletadas apenas 9 isolados foram detectados nos meios específicos para *Campylobacter* sp. Desses isolados foram identificadas por sistema bioquímico e enzimático, cepas dos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter*, sendo 3 pertencentes à espécie *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, 3 *Campylobacter coli*, 2 *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei* e 1 *Arcobacter cryoaerophilus*. Contudo, na identificação genotípica dessas cepas, todas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. Todos os isolados das carcaças amostradas apresentaram multi-resistência antimicrobiana, sendo resistentes à cefalotina, clindamicina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacin, tetraciclina, trimetropina e gentamicina e estreptomicina, podendo representar perigo para a saúde pública. Apenas 3 antimicrobianos, amoxicilina associada a ácido clavulânico, ampicilina e cloranfenicol mostraram inibição a todos os isolados. Os resultados obtidos mostraram que apesar da baixa frequência de isolamento de *Campylobacter* nas amostras avaliadas, todas as cepas apresentaram muti-resistência antimicrobiana e que por tratar-se de patógeno humano emergente, o risco de contaminação por *Campylobacter* pelo consumo de carne suína não deve ser desprezado.

Palavras-chave: *Campylobacter* sp., resistência antimicrobiana, reação de polimerase em cadeia

ABSTRACT -. The genus *Campylobacter* is considered by the World Health Organization and the World Organization for Animal Health the priority for monitoring in food of animal origin, mainly poultry and pork. In addition to its relevance as a agent of food-borne infections, the genus *Campylobacter* has drawn attention due to its antimicrobial resistance. This resistance may be related to the use of antibiotics in farm animals, as a preventive of disease or as growth promoters. Given the current importance of *Campylobacter* to public health, this study aimed to identify the strains of *Campylobacter* isolated from pigs during slaughter and check the resistance of these strains to antibiotics usually used to treat humans. Of 259 samples 9 strains of *Campylobacter* were isolated. The identification of isolates by phenotypic method showed strains belonging to the genus *Campylobacter* and *Arcobacter* and species *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* subsp. *Doyle* and *Arcobacter cryoaerophilus*. However, after PCR genotyping all isolates were identified as belonging to the genus *Campylobacter*. All isolates showed resistance to cephalothin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, nalidixic acid, norfloxacin, tetracycline, trimethoprim and streptomycin. Only 3 antimicrobials, amoxicillin combined with clavulanic acid, ampicillin and chloramphenicol, showed inhibition of all isolates. *Campylobacter* contamination of pig carcasses was low in the slaughterhouse evaluated, but all isolates showed multidrug resistance, which may represent a hazard to public health.

Keywords: *Campylobacter*, antimicrobial resistance to antibiotics, polimerase chain reaction

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de *Campylobacter* em alimentos têm sido frequentemente relatada, principalmente em alimentos produzidos em países industrializados. Devido à alta incidência de *Campylobacter* nos alimentos, esse gênero de micro-organismo é atualmente considerado o maior causador de diarreias agudas de origem alimentar na população europeia (GHAFIR et al., 2007; HUMPHREY et al., 2007).

Os produtos de origem animal, especialmente as carnes de frango, suína e bovina são reconhecidos como veículos primários de contaminação por *Campylobacter*, visto que esse gênero é considerado comensal do trato intestinal desses animais (AÇIK; ÇETINKAYA, 2006).

O gênero *Campylobacter* é comumente encontrado no trato intestinal dos suínos, sendo que as carcaças suínas mostram-se mais frequentemente contaminadas por este micro-organismo do que carcaças bovinas ou ovinas (NESBAKKEN et al., 2004).

Além de apresentar-se cada vez comum como causa de moléstias aos humanos, o gênero *Campylobacter* tem chamado a atenção por possuir resistência a medicamentos tradicionalmente usados no tratamento de enfermidades humanas (PEZZOTTI et al., 2003), sendo essa a maior preocupação atual com a campilobacteriose. A resistência antimicrobiana é relacionada ao uso de antibióticos para tratamento e prevenção de enfermidades nos animais criados sob sistema intensivo e também à larga utilização dessas drogas no tratamento de infecções sistêmicas e diarreias crônicas em humanos. Desta forma, os alimentos de origem animal podem representar um veículo para a transmissão de *Campylobacter* resistente aos humanos.

Devido à ampla distribuição do *Campylobacter* no mundo, diferentes índices de resistência são observados em diversos países. Em estudo realizado na Coreia do Sul por Han et al. (2007), cepas de *Campylobacter jejuni* encontradas em amostras de carne de frango crua apresentaram-se resistentes à tetraciclina, ao ácido nalidixico, à ampicilina e à ciprofloxacina. Segundo Shin e Lee (2007), os valores de resistência de *Campylobacter* a cada tipo de antibiótico variam entre os diferentes países. Para a gentamicina,

não foi encontrada resistência nos isolados de humanos da Alemanha, Dinamarca e Suécia, porém mais de 20% das cepas isoladas de humanos do Japão, Espanha e França apresentaram resistência a esse medicamento.

Recentemente, métodos moleculares são propostos como alternativa aos métodos sorológicos para a tipificação de *Campylobacter* (ERTAS et al., 2004). Com a crescente necessidade de se identificar e confirmar os isolados de amostras oriundas de alimentos, a aplicação de testes baseados em reações de polimerase em cadeia (PCR) são atrativos por apresentarem fácil preparo, baixo custo em relação à mão-de-obra e rápida obtenção dos resultados (LAGIER et al., 2004). A análise pela reação de polimerase em cadeia (PCR) é altamente indicada, pois ela permite, com maior confiabilidade, registrar a presença e identificar o micro-organismo estudado.

Diante da relevância atual do gênero *Campylobacter* como agente etiológico das infecções de origem alimentar, o objetivo do presente trabalho foi identificar as cepas de *Campylobacter* encontradas durante o processo de abate de suínos e verificar a resistência dessas cepas a antibióticos usualmente empregados no tratamento humano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PLANO DE COLETA DE AMOSTRAS

Para o presente estudo foram coletadas 259 amostras de carcaças suínas em um abatedouro de suínos com Serviço de Inspeção Federal localizado no Estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas de 37 carcaças suínas em 07 diferentes etapas da linha de abate durante o período de janeiro a julho de 2009.

A linha industrial de abate de suínos é constituída pelas etapas de insensibilização, sangria, escaldagem (62 a 72°C por 2 a 5 minutos), depilação, chameusamento, toailete, evisceração, divisão longitudinal da carcaça, classificação e refrigeração (7°C).

As etapas de coleta de amostras na linha de abate de suínos utilizadas neste trabalho compreenderam as seguintes operações (Figura 1):

- a) após a insensibilização e corte para sangria dos animais;

- b) após a depilação mecânica das carcaças;
- c) após o chamuscamento das carcaças,
- d) após a evisceração das carcaças;
- e) após a lavagem das carcaças;
- f) após o resfriamento das carcaças;
- g) após o corte do quarto traseiro da carcaça (início do espostejamento)

A escolha dos pontos de coleta baseou-se na definição desses pontos como críticos para o controle de contaminantes microbianos no abate de suínos no local avaliado.

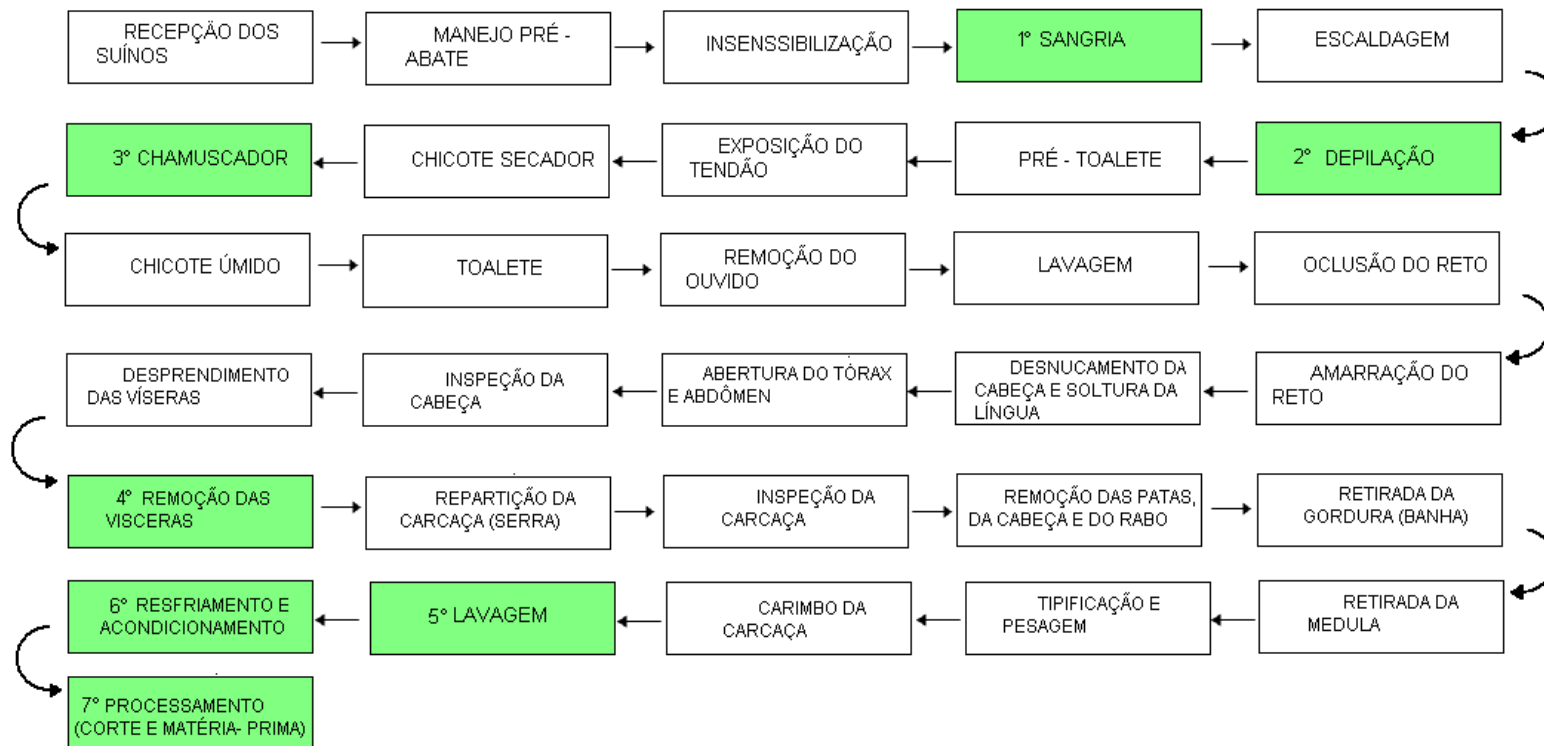


Figura 1 – Fluxograma do processo abate de suínos com as etapas selecionadas para coleta de amostras em destaque.

2.2 ISOLAMENTO BACTERIANO

O isolamento das cepas de *Campylobacter* sp. das amostras coletadas foi realizado mediante duas metodologias (Figura 2). Em uma delas, procedeu-se o pré-enriquecimento da amostra em caldo Bolton, acrescido de suplemento seletivo SR 208E (Oxoid) para a posterior transferência em ágar Bolton modificado (ABM). No segundo método, a amostra foi transferida diretamente para placas contendo ágar Bolton modificado (ABM). Em ambas as metodologias de isolamento, a incubação dos meios de cultura foi realizada sob atmosfera microaerófila a temperatura de $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas (FRANCHIN et al., 2005). Após a incubação, as colônias que apresentaram crescimento típico, morfologia característica (formato de asa de gaivota), motilidade de movimentos em saca rolhas e oxidase positiva foram consideradas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*.

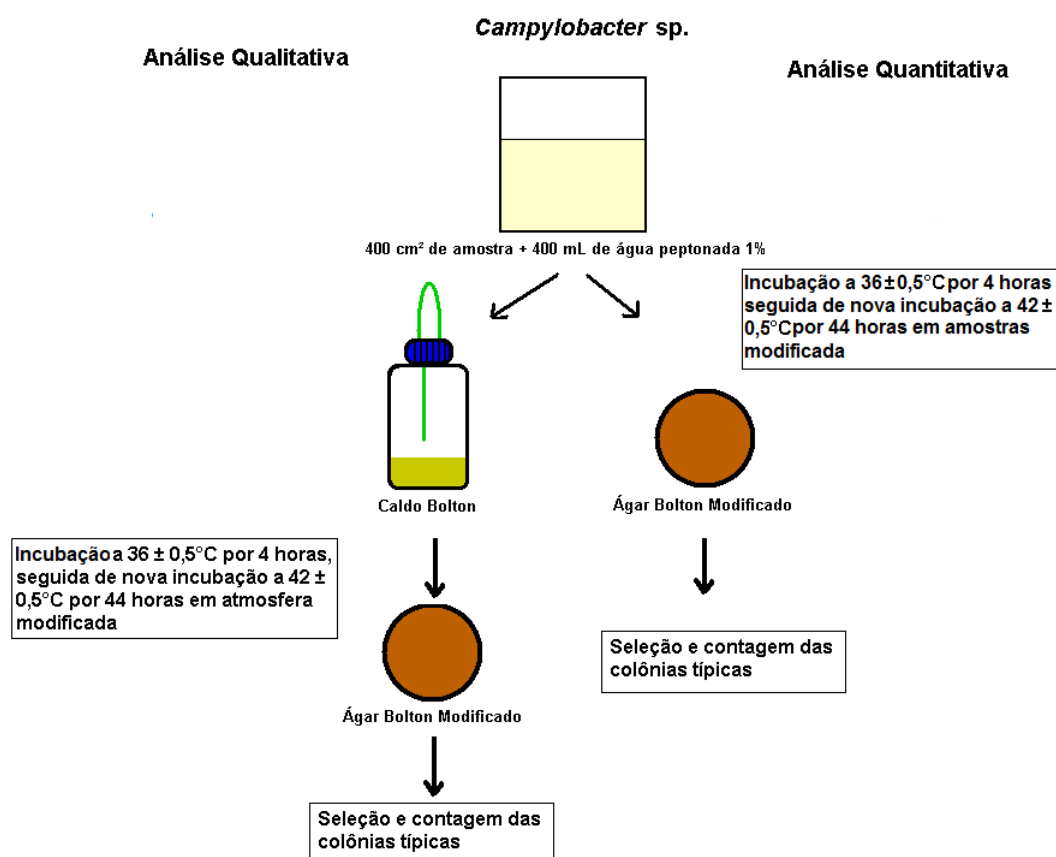


Figura 2 – Metodologias utilizadas para a determinação quantitativa e qualitativa de *Campylobacter*.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

2.3.1 Identificação bioquímica por API Campy

Para identificação das cepas de *Campylobacter* sp., utilizou-se o sistema bioquímico e enzimático API Campy (BioMérieux®). O procedimento de identificação iniciou-se pela transferência das colônias típicas para placas contendo ágar sangue (NewProv) que foram incubadas por 24 a 48 horas a temperatura $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em atmosfera microaerófila. As cepas isoladas no ágar sangue foram transferidas para diluente próprio do sistema API Campy (BioMérieux®) em densidade correspondente à número 6 da escala de McFarland (ProBac) para posterior inoculação dessas nas galerias de testes.

O sistema API Campy (BioMérieux®) consiste em um conjunto de 20 testes bioquímicos e enzimáticos para confirmação de espécies de *Campylobacter* sp., dos quais fazem parte as provas de urease (URE), redução dos nitratos (NIT), esterase (EST), redução de hipurato (HIP), gama glutamil transferase (GGT), redução do cloreto de trifetil-tetrazolium (TTC), pirrolidonil arilamilase (PyrA), L-arginina arilamidase (ArgA), L-aspartato arilamidase (AspA), fosfatase alcalina (PAL), produção de H_2S (H_2S), assimilação de D-glucose (GLU), de succinato de sódio (SUT), de acetato de sódio (ACE), de propionato (PROP), de malato (MLT) e de citrato trissódico (CIT); sensibilidade à eritromicina (ERO), resistência ao ácido nalidíxico (NAL) e à cefazolina de sódio (CFZ).

Uma cepa padrão de *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* (Remel) também foi submetida ao processo de identificação descrito anteriormente como controle positivo da análise microbiológica e para confirmação da acurácia do teste.

2.3.2 Identificação molecular por PCR em tempo real

Para a confirmação genotípica do gênero *Campylobacter* nos isolados identificados pelo sistema bioquímico foram utilizados o kits NewGene Prep (Simbios) e NewGene Preamp (Simbios) para a extração do DNA das cepas e a enzima Taq polimerase, o Kit Master Mix *Campylobacter* (Simbios) contendo

tampão, dNTP's, água, *primers* e sonda, segundo as instruções do fabricante, para a reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real.

Para a reação de polimerase em cadeia, foram adicionados em um microtubo 2 µL de DNA extraído das cepas e 28 µL do Master Mix com Taq polimerase, acondicionando-os em um termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) e procedendo-se 1 ciclo a 95°C por 3 minutos e na sequência, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto .

Na técnica de PCR em tempo real ocorre a amplificação convencional do DNA, porém a detecção de sua presença é realizada ao longo dos ciclos. Para que isso ocorra, uma molécula conhecida como SYBR *green* ou um oligonucleotídeo marcado com repórter é adicionado na reação e conforme a amplificação ocorre ao final de cada ciclo, um sinal fluorescente é emitido e captado por um sistema óptico, para então ser convertido em um gráfico de amplificação. Através desta técnica, níveis mais altos de sensibilidade são atingidos (KIDO; ANDRADE, [2009]).

Para a identificação genética por PCR, uma cepa de *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* (Remel) foi utilizada como controle positivo e uma prova em branco, contendo apenas o Kit Master Mix e a enzima Taq polimerase foi adotada como controle negativo.

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os isolados identificados como *Campylobacter* pelo teste bioquímico foram submetidos à avaliação da sensibilidade a antibióticos pela técnica de disco-difusão em ágar Müller-Hinton com 5% de sangue de carneiro utilizando a densidade de células de 0,5 na escala de McFarland (ProBac) segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

Foram testados antibióticos comumente utilizados no tratamento de enfermidades humanas como AMC (amoxicilina + ác. clavulânico 10 µg), AMP (ampicilina 10 µg), CFL (cefalotina 30 µg), CIP (ciprofloxacina 5 µg), CLI (clindamicina 2 µg), CLO (cloranfenicol 30 µg), EST (estreptomicina 10 µg), GEN (gentamicina 10 µg), NAL (ácido nalidíxico 30 µg), NOR (norfloxacina 10 µg), TET (tetraciclina 30 µg) e TRI (trimetropina 10 µg) (MURRAY 1995;

TRABULSI et al., 1999; RÖNNER et al., 2004; Diretiva 2007/516/EC da União Européia; SHIN e LEE, 2007).

A avaliação de sensibilidade ou resistência dos isolados ao ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, clindamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina e tetraciclina (Laborclin) foi determinada pela medida dos halos formados em milímetros seguindo critério proposto para o gênero *Campylobacter* por Huysmans e Turnidge (1997). Para os testes com amoxicilina associada a ácido clavulânico, estreptomicina e trimetropina (Laborclin) foram utilizados os padrões interpretativos de diâmetro dos halos de inibição para *Enterobacteriaceae* segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

3 RESULTADOS

Com relação à identificação das colônias isoladas das amostras, todas as colônias que apresentavam características típicas de *Campylobacter* (morfologia das células, coloração marrom, brilho metalizado, forma arredondada e bordas bem definidas) foram submetidas às provas de identificação bioquímica e enzimática pelo sistema API Campy previamente à sua confirmação molecular.

Os resultados obtidos na identificação pelo sistema API Campy mostraram a probabilidade, em porcentagem, da ocorrência de gêneros e espécies nas amostras avaliadas pela interpretação dos resultados da atividade bioquímica e enzimática da cultura testada com o auxílio de um programa de software fornecido pelo fabricante do teste (BioMérieux®). Essas provas indicaram a presença nos isolados dos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter*, ambos pertencentes à família *Campylobacteriaceae* (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da identificação pelo sistema API Campy das culturas isoladas nas amostras das carcaças suínas de acordo com o perfil bioquímico e enzimático apresentado.

Identificação da amostra	Etapas de coleta	Identificação do micro-organismo	Probabilidade* (%)
92	PD	<i>Campylobacter jejuni Doylei</i>	98,2%
129	PD	<i>Campylobacter jejuni Jejuni</i>	96,4%
187	PI	<i>Campylobacter coli</i>	99,9%
188	PD	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	99,0%
54	PD	<i>Campylobacter coli</i>	99,2%
63	PD	<i>Campylobacter jejuni Jejuni</i>	98,6%
64	PC	<i>Campylobacter coli</i>	99,6%
100	PR	<i>Campylobacter jejuni Doylei</i>	97,9%
43	PI	<i>Campylobacter jejuni Jejuni</i>	97,5%

*Probabilidade fornecida pelo sistema API Campy de identificação de espécies.

PD, pós depilação, PI, pós insensibilização, PC, pós chameamento, PR, pós refrigeração.

Dos 9 isolados, 2 (22,3%) foram identificados pelo sistema API Campy, como *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei*, 3 (33,3%) como *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, 3 (33,3%) como *Campylobacter coli* e 1 (11,1%) como *Arcobacter cryaerophilus*.

Na confirmação das cepas pela técnica de PCR em tempo real verificou-se que todas as culturas isoladas apresentaram DNA cromossômico compatível com o gênero *Campylobacter* com alta correlatividade, uma vez que todas as amostras apresentaram uma alta compatibilidade com o primer utilizado e uma rápida replicação de seu DNA (Figura 3), indicando que em todos os isolados havia a presença de *Campylobacter* sp.

Esse resultado mostrou diferenças na identificação de algumas cepas entre o método bioquímico/enzimático e o método molecular.

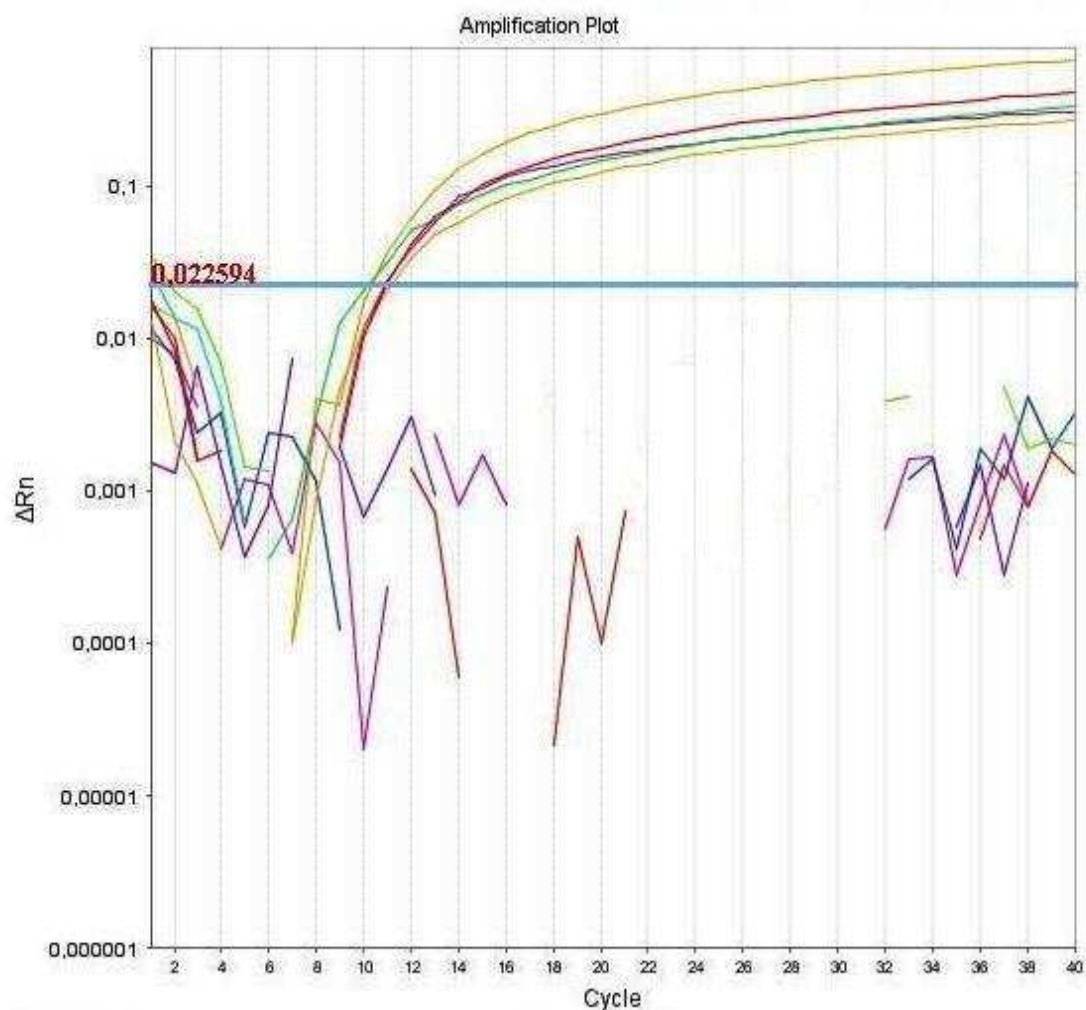


Figura 3 - Gráfico de reação de polimerase em cadeia em tempo real de amostras de carcaça suína positivas para *Campylobacter*.

Na Figura 3 é possível notar que a quantidade de micro-organismos pertencentes ao gênero *Campylobacter* nas amostras avaliada foi alta, uma vez que em poucos ciclos (eixo x) o nível de absorção (eixo y) aumentou consideravelmente e atingiu a estabilidade que pode ser verificada a partir do 16º ciclo.

Das 259 amostras de esfregaço das carcaças suínas, somente 9 (3,5%) apresentaram isolados bacterianos nos meios específicos para *Campylobacter* sp., os quais foram submetidos ao teste de resistência a antimicrobianos.

Dos 9 isolados testados, todos apresentaram-se resistentes a 5 (41,7%) princípios ativos antimicrobianos testados, cefalotina, ácido nalidíxico,

norfloxacin, tetracycline and trimethoprim. In tests with amoxicillin associated with clavulanic acid, ampicillin and chloramphenicol all 9 isolates (100%) showed sensitivity. For the remaining antibiotics tested there were variations in sensitivity, observing that 77,8% of resistance to ciprofloxacin, 44,5% for gentamicin, 33,3% to streptomycin and 77,8% to clindamycin (Figure 4).

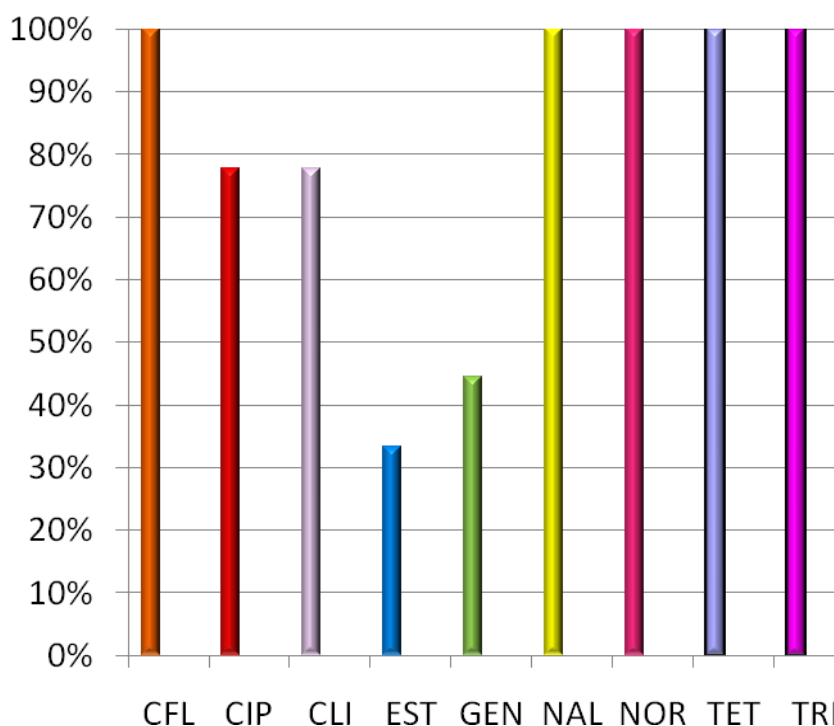


Figura 4 - Frequência de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Campylobacter* sp. coletados de carcaças suínas ao longo da linha de abate.

CFL (cefalotina 30 µg), CIP (ciprofloxacin 5 µg), CLI (clindamicina 2 µg), EST (estreptomicina 10 µg), GEN (gentamicina 10 µg), NAL (ácido nalidíxico 30 µg), NOR (norfloxacin 10 µg), TET (tetraciclina 30 µg), TRI (trimetropina 10 µg).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, os isolados foram identificados pelas provas bioquímicas e enzimáticas como *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*, 33,3%, *Campylobacter coli*, 33,3%, *Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei*, 22,2% e *Arcobacter cryaerophilus*, 11,1%.

Segundo Quinn et al. (2005) *Campylobacter coli* é considerada a espécie comensal do trato digestivo dos suínos. Hirsh e Zee (2003), Trabulsi et al. (1999) e Jay (2005) por sua vez, afirmam que *Campylobacter jejuni* é a espécie da família *Campylobacteriaceae* mais comumente isolada nos mais diversos animais e produtos de origem animal.

Workman et al. (2008) consideram os suínos como importante fonte de contaminação por *C. coli* após notarem em seu trabalho, que todos os isolados oriundos de suínos analisados foram identificados como pertencentes a esta espécie. A mesma constatação foi feita por Shin e Lee (2007) na Coréia também em pesquisa com suínos.

Porém, vários estudos relatam maior prevalência de *Campylobacter jejuni*, seguida por *Campylobacter coli* nos animais de produção. Bae et al. (2005) observaram prevalência de 34,1% de *C. jejuni* e 7,7% de *C. coli* em amostras bovinas. Zweifel et al. (2004) observaram que 64,9% e 35,1% das amostras ovinas estudadas continham *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente. Aşik e Çetinkaya (2006) em pesquisa realizada na Turquia relataram prevalências muito próximas entre *C. jejuni* (34,1%) e *C. coli* (33,1%).

A real eficiência das provas bioquímicas e enzimáticas para a identificação de micro-organismos vem sendo contestada, devido à observação de falhas quando estas provas são comparadas a resultados de testes genotípicos. Moran et al. (2009) verificaram que 41 cepas identificadas como *Campylobacter coli* pelo sistema fenotípico foram reconhecidas como *Arcobacter butzleri* quando aplicados testes genotípicos. Os mesmos pesquisadores concluíram que submeter a amostra testada a crescimento em temperatura de 25°C sob condições microaerófilas mostrou-se uma técnica adequada para a confirmação de *Campylobacter*, uma vez que *Arcobacter* desenvolve-se bem nesta temperatura ao contrário de *Campylobacter*.

No entanto, Reina et al. (1995) e Kuana et al. (2009) consideram o sistema API Campy como a melhor opção para identificação de espécie de isolados quando sistemas considerados mais eficientes não são viáveis.

Por outro lado, um dos fatores ligados a identificações errôneas pelo sistema API Campy está na dificuldade na leitura dos resultados apresentados por este teste. On (1996) afirma que apesar do sistema API Campy possuir diversos testes para identificação um fator agravante é a não inclusão de todas as espécies de importância clínica da família *Campylobacteriaceae* na lista relacionada pelo sistema.

Na identificação de *Campylobacter* pelo sistema bioquímico API Campy em relação a outros métodos Huysmans et al. (1997) relataram que ao comparar a eficiência do sistema API Campy em relação ao método fenotípico e bioquímico convencional de identificação de *Campylobacter* verificaram 100% de correlação entre os dois sistemas para a identificação de *C. jejuni*. No entanto, somente 66,6% das cepas de *C. lari* e 74% das cepas de *C. coli* foram identificadas igualmente pelos dois sistemas. Os mesmos autores observaram identificação errônea de *C. coli* e de *C. lari* pelo sistema API Campy como *Arcobacter cryaerophilus*.

Quando compararam uma forma de identificação fenotípica com outra baseada em métodos moleculares, Steinhäuserova et al. (2001) também apontaram diferenças nos resultados. Nos isolados obtidos de suínos, enquanto o método fenotípico identificou 3 isolados de *C. jejuni* e 40 de *C. coli*, o método molecular identificou apenas um dos 3 isolados de *C. jejuni* como sendo desta espécie, os outros dois foram identificados como *C. coli*. Dos 40 isolados identificados como *C. jejuni* fenotipicamente, 38 também foram confirmados pelo método molecular, porém os demais foram identificados como *C. jejuni*. Devido às diferenças na identificação entre os dois métodos, os pesquisadores concluíram que no momento da escolha do método, a melhor opção é avaliar os pontos fracos das metodologias disponíveis a fim de tentar compensar as falhas.

Desta forma, para uma maior garantia nos resultados On (1996). recomenda que cepas padrão do micro-organismo sejam testadas juntamente com os isolados, uma vez que os métodos de identificação de *Campylobacter*

ainda precisam de melhorias para garantir uma maior acurácia do resultado fornecido.

A introdução de agentes antimicrobianos na terapêutica humana e dos animais constituiu um grande avanço para o crescimento da população e da produção de alimentos. Os primeiros agentes antimicrobianos foram introduzidos durante os anos 30 e a resistência a essas drogas surgiram gradativamente conforme seu emprego foi sendo difundido. Contudo, nos últimos dez anos, o isolamento de micro-organismos resistentes a drogas antimicrobianas utilizadas em animais de produção tem mostrado grande repercussão (EFSA, 2008).

Em virtude da classificação do *Campylobacter* como patógeno humano emergente, os estudos de seu monitoramento nas cadeias produtivas avícola e suína são recentes. Neste sentido, os critérios para os testes de sensibilidade a antimicrobianos, assim como outros parâmetros para o controle de *Campylobacter* ainda não foram harmonizados internacionalmente.

Devido à incipiência de conhecimentos sobre a resistência antimicrobiana de *Campylobacter* e da não definição de padrões de resistência a antibióticos próprios para o gênero, em muitos países como os pertencentes à União Européia (Diretiva 2007/516/CE) sugere-se a interpretação de resultados utilizando-se padrões definidos para outros micro-organismos.

Pesquisas relacionadas à sensibilidade a antibióticos em todo o mundo mostram diferentes graus de resistência para os mesmos antibióticos testados (GEBREYES et al., 2005; GUÉVREMONT et al., 2006; HAN et al., 2007; ALBAN et al., 2007; ARMI et al., 2007; LITTLE et al., 2008; MORAN et al., 2009).

Neste estudo observou-se que todos os isolados identificados como *Campylobacter* apresentaram resistência antimicrobiana a no mínimo 5 dos princípios ativos testados, indicando multi-resistência a drogas.

A resistência a várias drogas em amostras suínas também foi registrada por demais pesquisadores como Gebreyes et al. (2005) e Guevremont et al. (2005) e em amostras originárias de outras espécies animais. Little et al. (2008) em sua pesquisa com bovinos e suínos, Laungtongkum et al. (2006) com aves, Inglis et al. (2005) com bovinos e Mayrhofer et al. (2004) com bovinos, aves e suínos.

Todos os isolados apresentaram-se sensíveis ao cloranfenicol, amoxicilina associada a ácido clavulânico e ampicilina. A sensibilidade ao cloranfenicol por todos os isolados também foi observado por Sáenz et al. (2000) e Guévremont et al. (2006) em amostras de suínos e por Bardon et al. (2009) e Mifflin et al. (2007) em isolados de humanos e de frango, respectivamente.

Para ampicilina, altos índices de resistência foram registrados por Little et al. (2008) (57,3%) e Sáenz et al. (2000) (65,7%) em isolados de amostras suínas e por Han et al. (2007) (43,1%) e Mifflin et al. (2007) (40,8%) em isolados de amostras de frango ao contrário do observado no presente trabalho, para a qual nenhuma das cepas isoladas mostrou resistência.

Por outro lado, o valor de resistência à gentamicina (44,5%), nesta pesquisa, foi alto quando comparado aos obtidos por outros pesquisadores como Shin e Lee (2007), Guévremont et al. (2006), Little et al. (2008), Sáenz et al. (2000), Pezzotti et al. (2003) e Gebreyes et al. (2005) que observaram resistências de 20,2%, 5%, 0%, 22,2%, 6,25% e 0,2%, respectivamente.

Nos testes realizados com cefalotina, ácido nalidíxico, norfloxacin, tetraciclina e trimetropina, todos os isolados mostraram-se resistentes. Sáenz et al. (2000) também observaram 100% de resistência das cepas de *Campylobacter* isoladas na Espanha para cefalotina e ácido nalidíxico e 94,4% de resistência à tetraciclina. Kang et al. (2006) verificaram resistência para ácido nalidíxico de 91% em isolados de *Campylobacter* oriundos de carne de frango.

Bardon et al. (2009) observaram maior resistência antimicrobiana em isolados de *C. jejuni* de aves do que em isolados da mesma espécie a partir de fezes de humanos de pacientes com enfermidades intestinais. A única exceção ocorreu para a tetraciclina, com maior frequência de resistência nas cepas de origem humana. Os mesmos autores encontraram a maior resistência antimicrobiana de *Campylobacter* para os antibióticos do grupo das quinolonas. Neste sentido, observou-se resistência à ciprofloxacina em 72% dos isolados de frangos e 55% dos isolados de origem humana. Esses resultados assemelham-se aos encontrados no presente trabalho para a resistência à ciprofloxacina (77,8%). Contrariando as altas taxas de resistência às quinolonas por *Campylobacter*, Mifflin et al. (2007) verificaram sensibilidade à

ciprofloxacina para todas os 152 isolados de *Campylobacter* de frangos na Austrália, enquanto Inglis et al. (2005) encontraram resistência em apenas 0,3% dos isolados de bovinos no Canadá.

Em 2006, dados relatados pela *European Food Safety Authority* (EFSA) indicaram taxa de 57% de resistência à ciprofloxacina para cepas de *Campylobacter* sp. na Itália e 53% de resistência na Alemanha. As menores taxas de resistência às quinolonas para as cepas de *Campylobacter* sp. isoladas de frangos entre os países da Europa foram observadas nos países escandinavos. Na Dinamarca, verificou-se taxa de 7% de resistência a esse grupo de antibióticos ao passo que na Suécia, nenhuma resistência a quinolonas foi encontrada em *C. jejuni* isolados de frangos (EFSA, 2007).

Essas reduzidas taxas de resistência antimicrobiana observadas nos países nórdicos devem-se principalmente à implantação de programas nacionais de monitoramento de patógenos em alimentos de origem animal e à proibição do uso de promotores de crescimento nos animais de produção.

Análises de sequenciamento genético de *C. coli* mostraram que em 64% dos isolados de suínos, a resistência a quinolonas estava associada à mutação no gene GyrA (GUÉVREMONT et al., 2006; EFSA, 2008). Muitos autores têm demonstrado que o uso de antibióticos na produção animal tem grande atuação na disseminação de genes resistentes a antimicrobianos dos animais aos humanos (AARESTRUP; WEGENER, 1999; GUÉVREMONT et al., 2006).

Devido ao elevado uso de ciprofloxacina no tratamento de infecções humanas, o teste de resistência de *Campylobacter* a esse antibiótico é particularmente relevante nos programas de monitoramento desse patógeno (EFSA, 2008).

A presença de isolados de *Campylobacter* resistentes a múltiplos antibióticos em todo o mundo é justificada por diversos pesquisadores como resultado do uso massivo de antibióticos nas cadeias de produção animal e também no tratamento de enfermidades humanas sem a real necessidade de medicação (PEZZOTTI et al., 2003; MAYRHOFER et al., 2004; RÖNNER et al., 2004).

Dos 12 antibióticos testados no presente trabalho, 7 deles não são utilizados em terapias ou profilaxia de doenças no sistema de produção de

suínos da empresa pesquisada, sendo 5 princípios, utilizados com alguma das finalidades citadas.

Dentre os 3 princípios ativos para os quais 100% das cepas testadas mostraram sensibilidade (amoxicilina associada a ácido clavulânico, ampicilina e cloranfenicol), 2 não são empregados no sistema de produção de suínos. Com relação às demais 9 drogas para as quais as cepas apresentaram algum nível de resistência (cefalotina, ciprofloxacina, clindamicina, estreptomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, norfloxacin, tetraciclina, trimetropina), 5 não são empregadas na produção dos suínos avaliados.

Devido à diversidade dos resultados obtidos para a resistência aos antibióticos testados, não foi possível estabelecer uma relação entre o uso dos princípios ativos no sistema de produção dos suínos e a resistência antimicrobiana.

5 CONCLUSÃO

Nas provas bioquímicas e enzimáticas de identificação das cepas isoladas das carcaças verificou-se que uma das cepas foi identificada como *Arcobacter*, gênero também pertencente à família *Campylobacteriaceae*. Contudo, essa cepa foi confirmada como *Campylobacter* nos testes moleculares.

A espécie mais frequentemente encontrada nas carcaças suínas foi *Campylobacter jejuni*.

Todos os isolados mostraram multi-resistência antimicrobiana, apresentando resistência ao ácido nalidíxico, cefalotina, norfloxacin, tetraciclina e trimetropina.

Tendo em vista a importância do gênero *Campylobacter* nas afecções intestinais humanas e da sua ocorrência nos animais de produção, faz-se necessário o contínuo monitoramento desse micro-organismo pela notificação das tendências de resistência antimicrobiana com vistas à efetiva implantação de políticas de controle do emprego de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microbes and Infection**. v. 1, p. 639-644, 1999.

AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 370-375, 2006.

ALBAN, L.; NIELSEN, E.O.; DAHL, J. A human health risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with the use of macrolides in Danish pig production. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 83, p. 115-129, 2008.

ARMI, A.A.A.; SENOK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; AL-MAHMEED, A.E.; BOTTA, G.A. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 1350-1355, 2007.

BAE, W.; KAYA, K.N.; HANCOCK, D.D.; CALL, D.R.; PARK, Y.H.; BESSER, T.E. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. **Applied and environmental microbiology**. v. 71, p. 169-174, 2005.

BARDON, J.; KOLAR, M.; CEKANOVA, L.; HEJNAR, P.; KOUKALOVA, D. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. **Zoonoses Public Health**. v. 56, p. 111-116, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo, M100 S15. 2005 Disponível em <

<http://www.techstreet.com/info/clsi.tmpl?sid=goog&gclid=CPDe46iFiJ4CFWpd5QodDI1UpQ>> Acesso em: 28 ago. 2008.

Diretiva 2007/516/EC da União Européia. **Decisão da Comissão de 19 de julho de 2007, relativa à participação financeira da Comunidade para a realização, nos Estados-Membros, de um estudo sobre a prevalência e a resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e sobre a prevalência de *Campylobacter* spp. e de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos.** Disponível em: <http://eurlex.europa.eu//> > Acesso em: 13 mar. 2008.

EFSA, European Food Safety Authority - Working Group on Developing Harmonised Schemes for Monitoring Antimicrobial Resistance in Zoonotic Agents. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. **Clinical Microbiology Infection.** v. 14, p. 522-533, 2008.

ERTAS, H.B.; ÇETINKAYA, B.; MUZ, A.; ÖNGÖR, H. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. **International Journal of Food Microbiology.** v. 94, p. 203-209, 2004.

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, p. 157-162, 2005.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; MORROW, W.E.M. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 56, p. 765-768, 2005.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; de ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production

stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 111-120, 2007.

GUÉVREMONT, E.; NADEAU, É.; SIROIS, M.; QUESSY, S. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* from humans, swine, and chicken broilers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 70, p. 81-86, 2006.

HAN, K.; JANG, S.S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **Food Microbiology**. v. 114, p. 50-59, 2007.

HIRSH, D.C; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S; MADSEN, M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 237-257, 2007.

HUYMANS, M.B.; TURNIDGE, J.D. Disc susceptibility testing for thermophilic *Campylobacters*. **Pathology**. v. 29, p. 209-216, 1997.

INGLIS, G.D.; MCALLISTER, T.A.; BUSZ, H.W.; YANKE, L.J.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E.; READ, R.R. Effects of Subtherapeutic Administration of Antimicrobial Agents to Beef Cattle on the Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 71, p. 3872-3881, 2005.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 712 p.

KANG, Y.S.; GHO, Y.S.; YOON, S.K.; YU, M.A.; KIM, C.M.; LEE, J.O.; PYUN, Y.R. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and

Campylobacter coli Isolated from Raw Chicken Meat and Human Stools in Korea. **Journal of Food Protection**. v. 9, p. 2915-2923, 2006.

KIDO, E.A.; ANDRADE, P.P. **Genética e Biologia Molecular**. Disponível em: <<http://www.ufpe.br/biolmol/index.htm>> Acesso em 01 mar. 2009.

KUANA, S.L.; DOS SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; DO NASCIMENTO, V.P. Sistema API Campy para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, swabs cloacais e carcaças de frangos de corte. **Arquivos do Instituto de Biologia de São Paulo**. v. 76, p. 273-277, 2009.

LAGIER, M.J.; JOSEPH, L.A.; PASSARETTI, T.V.; MUSSER, K.A.; CIRINO, N.M. A real- time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation o *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 18, p. 275-282, 2004.

LAUNGTONGKUM, T.; MORISHITA, T.Y.; EL-TAYEB, A.B.; ISON, A.J.; ZHANG, Q. comparison of antimicrobial susceptibility testing of *campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006.

LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meat in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003- 2005. **Food Microbiology**. v. 25, p. 538-543, 2008.

MAYRHOFER, S.; PAULSEN, P.; SMULDERS, F.J.M.; HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 23-29, 2004.

MIFLIN J.K.; TEMPLETON, J.M.; BLACKALL, P.J. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-

East Queensland region. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 775-778, 2007.

MORAN, L.; SCATES, P.; MADDEN, R.H. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. **Journal of Food Protection**. v. 72, p. 1830-1835, 2009.

MURRAY, P. **Manual of clinical microbiology**. 6. Ed. Washington : AMS Press, 1995. 2256 p.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HØIDAL, H. K.; RØTTERUD, O. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**. v. 80, p. 231-240, 2003.

ON, S.L.W. Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. **Clinical Microbiology**. v. 9, p. 405-422, 1996.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals ad meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 82, p. 281-287, 2003.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

REINA, J.; ROS, M.J.; SERRA, A. Evaluation of the API-Campy system in the biochemical identification of hippurate negative campylobacter strains isolated from feaces. **Journal of clinical pathology**. v. 48, p. 683-685, 1995.

RÖNNER, A.; ENGVALL, E.O.; ANDERSSON, L.; KAIJSER, B. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in

Sweden. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96, p. 173-179, 2004.

SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; LANTERO, M.; GASTANARES, M.J.; BAQUERO, J.; TORRES, C. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 267-271, 2000.

SHIN, E.; LEE, Y. Antimicrobial resistance of 114 porcine isolates of *Campylobacter coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 118, p. 223-227, 2007.

STEINHAUSEROSA, I.; CESÍKOVÁ, J.; FOJTIKOVÁ, K.; OBROVSKA, I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, p. 470-475, 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 720 p.

ZWEIFEL, C.; ZYCHOWSKA, M.A.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, p. 45-53, 2004.

WORKMAN, S.N.; MATHISON, G.E.; LAVOIE, M.C. An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 106-111, 2008.